

# **Fluoreszenzlebensdauer-Korrelations- spektroskopie zum Nachweis und zur Quantifizierung von Kupfer(II)-Ionen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

von

M. Sc. Andreas Grüter

Saarbrücken

2018

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2013 bis November 2016 unter Anleitung von Prof. Dr. Gregor Jung am Institut für Biophysikalische Chemie der Universität des Saarlandes angefertigt.

Tag des Kolloquiums: 5. April 2019

Dekan: Prof. Dr. Guido Kickelbick

Berichterstatter: Prof. Dr. Gregor Jung

Prof. Dr. Marc Schneider

Vorsitz: Prof. Dr. Alexandra Kiemer

Akad. Mitarbeiter: Dr. Bernd Morgenstern

*The world fascinates me.*

Andy Warhol

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen die mich auf dem Weg zu meiner Promotion begleitet haben bedanken. Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Gregor Jung. Dank ihm durfte ich sehr frei an einem sehr interessanten, modernen und anspruchsvollen Thema forschen. Sein offener und sehr engagierter Umgang mit seinen Doktoranden und Mitarbeitern hat es mir ermöglicht über den Tellerrand zu schauen und auch Wissen außerhalb der Chemie anzueignen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Kaspar Hegetschweiler, der mich während dieser Zeit als wissenschaftlicher Begleiter betreut hat. Ebenso danke ich Prof. Dr. Marc Schneider für die Begutachtung der vorliegenden Dissertation.

Ein ganz besonderer Dank geht an den Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) und an Prof. Dr. Thorsten Wohland von der National University of Singapore. Danke für einen unvergesslichen Aufenthalt in Singapur, in dem ich unheimlich viel lernen und unfassbar tolle Eindrücke gewinnen konnte.

Vielen Dank an Prof. Dr. Alexandra Kiemer für die Zusammenarbeit und Dr. Stephan Laggai für die Bereitstellung der Zellkulturen. Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Rolf Müller für die Bereitstellung der technischen Möglichkeiten zur Aufreinigung und Strukturaufklärung. Der meiste Dank gebührt allerdings seinem Mitarbeiter Michael Hoffmann, für die Durchführung der Analysen, vielmehr jedoch für die Unterstützung und gute Zeit während des gesamten Studiums und der Promotionszeit.

Mein Dank geht weiterhin an alle die mich während des Studiums und der Promotion begleitet haben. Ganz besonders zu nennen seien da Michael Vester, den besten Büro-Bro, den man sich wünschen kann, Björn Finkler, Anh-Minh Huynh und Marcel Wirtz für die gute Zeit und den ganzen Blödsinn, den wir zusammen angestellt haben und Dagmar Auerbach, für die zwar kurze aber angenehme Zeit. Nicht vergessen möchte ich Daniel Maus, Anne Clasen, Johannes Menges, Sascha Grandjean und Isabelle Filbrich, die mich die letzten Jahre begleitet haben und die regelmäßig bei den Ausrufezeichentagen dabei waren.

Mein größter Dank geht allerdings an meine Familie, Freunde und meine Jungs, die immer für eine gute Ablenkung und Abwechslung von der Uni gesorgt haben. Ganz besonders gilt das allerdings für meine Freundin Jana Huber, die trotz meiner Quängeleien und Beschwerden immer zu mir gehalten und mich unterstützt hat.

# Zusammenfassung

Aufgrund der Eigenschaft zwischen seinen beiden Redoxzuständen zu wechseln, stellt Kupfer eines der wichtigsten Übergangsmetalle in Organismen dar. Dort kann es eine Vielzahl an Prozessen katalysieren. Diese Redoxaktivität hat zur Folge, dass Organismen eine strenge Regulation des Kupferhaushaltes benötigen. Eine gestörte Kupferhomöostase kann verschiedene pathologische Prozesse mit weitreichenden Auswirkungen auf den betroffenen Organismus auslösen. Beispielsweise kann eine dysfunktionale Kupferhomöostase zu neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson führen. Die genaue Rolle von Kupfer ist bei vielen Krankheiten und Prozessen jedoch noch nicht abschließend geklärt.

In dieser Arbeit wird ein hochaffiner Kupfersensor basierend auf einem natürlich vorkommenden Tetrapeptid synthetisiert. Der Sensor ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen, dessen Fluoreszenzlebensdauer bei Komplexbildung von Kupfer(II)-Kationen aufgrund von FRET abnimmt. Die spektroskopischen Eigenschaften sowie das Verhalten gegenüber Übergangsmetallkationen werden beschrieben. Es wird gezeigt, dass mit Hilfe der Fluoreszenzlebensdauer-Korrelationsspektroskopie die Konzentration des Sensors und des Sensor-Kupfer-Komplexes gleichzeitig auf Einzelmolekülebene bestimmt werden kann. Diese Arbeit zeigt einen möglichen Ansatzpunkt für eine neue Art von Sensoren und Messmethoden für zukünftige *in-vivo* Messungen, um das Verständnis über die exakte Rolle von Kupfer-Ionen in Organismen zu vertiefen.

## Abstract

Due to its redox-cycling capability, copper is one of the most important transition metals in many organisms in which it catalyzes a manifold of different processes. As a result of copper's redox-activity, organisms have to maintain a strict copper homeostasis. A dysfunctional copper homeostasis may lead to multifarious pathological processes in cells with very severe ramifications for the affected organisms. In humans for example a dysfunctional copper homeostasis may lead to neurodegenerative diseases like Alzheimer's or Parkinson's Disease. In many diseases and processes the exact role of copper ions is still not completely clarified.

In this work, a high affinity copper sensor based on a naturally occurring tetrapeptide is synthesized. The sensor is tagged with a fluorescent dye whose fluorescence lifetime decreases on binding to copper(II)-cations due to resonant energy transfer from the dye to the copper(II)-peptide-complex. Its photophysical properties and behavior toward transition-metal ions are characterized and investigated. It is shown that by using fluorescence lifetime correlation spectroscopy, the concentration of both sensor and sensor-copper-complex can be simultaneously measured on a single molecule level. Conclusively, this work presents a possible starting point for a new type of sensor and measurement for future *in-vivo* studies to further the understanding of the exact role of copper-ions in organisms.

# Publikationen und Konferenzbeiträge

## Veröffentlichungen

Kazmaier U, Doroshenko T, Bauer K, Filbrich I, **Grueter A**, Jung G, Ullrich A (2017) Coumaryl Triflate, a Versatile Building Block for the Modification of Coumarins and for Fluorescence Labeling. *Synthesis* 49: 2743-2748

Finkler B, Riemann I, Vester M, **Grüter A**, Stracke F, Jung G (2016) Monomolecular pyrenol-derivatives as multi-emissive probes for orthogonal reactivities. *Photochem Photobiol Sci* 15:1544–1557.

Vester M, **Grueter A**, Finkler B, Becker R, Jung G (2016) Biexponential photon antibunching: recombination kinetics within the Förster-cycle in DMSO. *Phys Chem Chem Phys* 18:10281–10288.

Schmidt L, Doroshenko T, Barbie P, **Grüter A**, Jung G, Kazmaier U (2016) Synthesis of Fluorescent Amino Acids via Palladium-Catalyzed Allylic Alkylations. *Synth* 48:3077–3086.

Eshaghi M, Sun G, **Grüter A**, Lim CL, Chee YC, Jung G, Jauch R, Wohland T, Chen SL (2015) Rational Structure-Based Design of Bright GFP-Based Complexes with Tunable Dimerization. *Angew Chemie Int Ed* 54:13952–13956.

Wirtz M, **Grüter A**, Heib F, Huch V, Zapp J, Herten D-P, Schmitt M, Jung G (2015) A two-color fluorogenic carbene complex for tagging olefins via metathesis reaction. *Methods Appl Fluoresc* 3:44001.

Wirtz M, **Grüter A**, Rebmann P, Dier T, Volmer DA, Huch V, Jung G (2014) Two-Color Emissive Probes for Click Reactions. *Chem Commun* 50:12694–12697.

## Konferenzbeiträge

### *Vorträge*

**A. Grüter**, Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy for the Determination of Copper(II)-Ions, PicoQuant 20<sup>th</sup> International Workshop on “Single Molecule and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences” **2014**, Berlin, Germany

### *Poster*

**A. Grüter**, M. Finkler, G. Jung, Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy for the Detection and Quantification of Copper(II), 14<sup>th</sup> Conference on Methods and Applications of Fluorescence, **2015**, Würzburg, Germany

**A. Grüter**, M. Finkler, G. Jung, Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy for the Detection and Quantification of Copper(II), Focus on Microscopy 2015, **2015**, Göttingen, Germany

**A. Grüter**, A.M. Huynh, M. Finkler, G. Jung, Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy for the Detection and Quantification of Copper(II) Ions, 113th General Assembly of the German Bunsen Society for Physical Chemistry, **2014**, Hamburg, Germany

**A. Grüter**, A.M. Huynh, M. Finkler, K. Brix, G. Jung, Using the Fluorescence Lifetime of GFP to detect and quantify copper(II) ions, 13<sup>th</sup> Conference on Methods and Applications of Fluorescence, **2013**, Genoa, Italy

D. Auerbach, **A. Grüter**, B. Hötzer, G. Jung, Ultrasensitive Determination of the Chromophore Formation Efficiency of GFP, Annual Meeting of the German Biophysical Society, **2010**, Bochum, Germany



# Inhalt

Abkürzungsverzeichnis .....	III
1 Einleitung .....	1
1.1 Das essentielle Spurenelement Kupfer .....	1
1.2 Fluoreszenzsonden und Reporter .....	2
1.3 Motivation .....	7
1.4 Aufbau der Arbeit .....	8
2 Theorie .....	9
2.1 Die biologische Rolle von Kupfer in eukaryotischen Zellen .....	9
2.1.1 Die Rolle und Funktion von Kupfer .....	10
2.1.2 Aufrechterhaltung der Kupferhomöostase .....	12
2.1.3 Pathologische Prozesse einer dysfunktionalen Kupferhomöostase .....	13
2.1.4 Kupfer-sonden in biologischen Proben .....	15
2.2 Wechselwirkung Licht-Materie .....	21
2.2.1 Lichtabsorption und Folgeprozesse .....	21
2.2.2 Absorptions- und Fluoreszenzspektren .....	25
2.2.3 FRET .....	27
2.3 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen – TCSPC .....	33
2.3.1 Messprinzip .....	34
2.3.2 Instrumentelle Antwortfunktion – IRF .....	38
2.3.3 Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie – FLIM .....	40
2.3.4 Artefakte .....	40
2.4 Korrelationsspektroskopie .....	43
2.4.1 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie – FCS .....	45
2.4.2 Fluoreszenzlebensdauer-Korrelationsspektroskopie – FLCS .....	59
2.5 Design des Sensors .....	68
3 Material und Methoden .....	72
3.1 Spektroskopische Methoden .....	73

3.1.1	Stationäre Spektroskopie.....	73
3.1.2	Zeitaufgelöste Spektroskopie .....	73
4	Experimentelles.....	83
4.1	Synthese und Charakterisierung des Sensors .....	83
4.1.1	Synthese .....	85
4.1.2	Aufreinigung und Strukturaufklärung.....	87
4.1.3	Spektroskopische Eigenschaften des DAHK-BDPY .....	92
4.2	Das Verhalten des DAHK-BDPY gegenüber Metall-Kationen insbesondere gegenüber $\text{Cu}^{2+}$ .....	96
4.2.1	Das Molekül DAHK-BDPY in Gegenwart von Metallkationen .....	96
4.2.2	Das Verhalten von DAHK-BDPY in Gegenwart von $\text{Cu}^{2+}$ -Kationen .....	99
4.2.3	Fluoreszenztitrationsen .....	106
4.2.4	Fluoreszenzlebensdauertitrationsen <i>in vitro</i> .....	120
4.2.5	FLCS Titrationsen <i>in vitro</i> .....	128
5	Zusammenfassung.....	143
6	Ausblick .....	148
7	Abbildungsverzeichnis.....	151
8	Literatur.....	160
A	Anhang .....	180

## Abkürzungsverzeichnis

(f)ALS	(Familiäre) Amyotrophe Lateralsklerose
$\vec{\mu}_{ab}$	Übergangsdipolmoment
A	Amplitude
ACF	Autokorrelationsfunktion
ACN	Acetonitril
AD	Alzheimer-Krankheit
AMP	Adenosinmonophosphat
apo	griechisch: Ohne
$^{app}K_D$	scheinbare Dissoziationskonstante
ATCUN	Amino terminal copper and nickel binding site
Atox1	Antioxidant 1 copper chaperone
BODIPY/	
BDPY	Bor-dipyrromethen
CCF	Kreuzkorrelationsfunktion
CCS	Copper Chaperone for superoxide dismutase
CEF	Einsammelfunktion
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
$^cK_D$	scheinbare Dissoziationskonstante
COSY	Correlated Spectroscopy
COX	Cytochrom C-Oxidase
cpm	Counts per molecule
cps	Counts per second
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTR1	Human Copper Importer
DAD	Diodenarray Detektor
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMSO-d6	Deuteriertes Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
(E)GFP	(Enhanced) Grün fluoreszierendes Protein

---

E	Energie
EDTA	Etyhlendiamintetraessigsäure
EE	Essigsäureethylester
$E_{\text{FRET}}$	FRET-Effizienz
ESI	Elektrospray Ionisation
$f$	Repetitionsrate Laser
$f$	Filterwert
FA	Ameisensäure
FCCS	Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
fFCS	gefilterte Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FLIM	Fluoreszenzlebensdauer Mikroskopie
FLCS	Fluoreszenzlebensdauer-Korrelationsspektroskopie
FRET	Förster Resonanzenergietransfer
FT-ICR	Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz
$G(\tau)$	Autokorrelationsfunktion
HAc	Essigsäure
holo	griechisch: Ganz
HOMO	Höchstbesetztes Molekülorbital
HSA	Humanalbumin
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
Hz	Hertz
$I_{\text{DEC}}$	Fluoreszenzintensitätszerfall
$I_0$	Fluoreszenzintensität
IC	Innere Konversion
IRF	Instrumente-Antwort-Funktion
ISC	Intersystem Crossing
ITC	Isotherme Titrations Kalorimetrie
k	Ratenkonstante
K	Gleichgewichtskonstante
$K_A$	Bildungskonstante

$\kappa$	Orientierungsfaktor
$K_D$	Dissoziationskonstante
$k_{ns}$	Nichtstrahlende Ratenkonstante
$k_{rad}$	Strahlende Ratenkonstante
$\lambda$	Wellenlänge
LUMO	Niedrigstbesetztes Orbital
M	mol/L
MAPK	Mitogen-activated-protein-Kinase
MDF	Moleküldetektionsfunktion
MEK1/2	Mitogen-activated-protein-kinase-kinase 1/2
MS	Massenspektrometrie
n	Brechungsindex
$n_{bin}$	Anzahl der TCSPC-Zeitkanäle
N	Teilchenzahl
$N_A$	Avorgado-Zahl
NA	Numerische Apertur
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NTA	Nitrilotriessigsäure
o.u.	Optische Einheit
P	Leistung
PBS	Phosphate buffered saline
PD	Parkinson-Krankheit
PE	Petrolether
PET	Photoinduced Electron Transfer
$R_0$	Förster-Radius
RNS	Reaktive Stickstoff Spezies
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
S/N	Signal-zu-Rausch
$S_0$	Elektronischer Grundzustand
$S_1$	Erster angeregter elektronischer Zustand

---

SOD1	Cu/Zn-Superoxid-Dismutase
SPAD	Single Photon Avalanche Diode
T	Triplett Zustand
t	Zeit
t <sub>3</sub>	s. TTTR
TCSPC	Time correlated single photon counting - Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen
TEM <sub>00</sub>	Transverse Mode 00
THF	Tetrahydrofuran
TOSCY	Total Correlated Spectroscopy
TTTR	Time Tagged Time Resolved
V <sub>eff</sub>	Effektives Volumen
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
$\tau$	Verzögerungszeit
$\tau_{fl}$	Experimentelle Fluoreszenzlebensdauer
$\tau_{fl, amp}$	Amplitudengewichtete Fluoreszenzlebensdauer
$\tau_{rad}$	natürliche Fluoreszenzlebensdauer
$\varphi$	Phasenwinkel
$\Phi$	Quantenausbeute

# 1 Einleitung

## 1.1 Das essentielle Spurenelement Kupfer

Wie fast alle Übergangsmetalle der vierten Periode des Periodensystems spielt Kupfer eine essentielle Rolle im Metabolismus aller Organismen.<sup>[1]</sup> Eine strenge Regulierung der Kupferhomöostase ist für einen gesunden Organismus unerlässlich. Kupfer ist ein sehr wichtiges Element in den aktiven Zentren vieler Enzyme, wo es, aufgrund seiner Redoxaktivität zwischen  $\text{Cu}^+$  und  $\text{Cu}^{2+}$ , an einer großen Anzahl von zellulären Redoxprozessen teilnehmen kann. Eine Vielzahl von schweren neurodegenerativen Krankheiten wird mit der Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Kupferionen (Familiäre Amyotrophe Lateralsklerose)<sup>[2]</sup>, der kupferinduzierten Aggregation von Proteinen (Alzheimer, Parkinson)<sup>[3]</sup> und einer pathologisch veränderten Kupferhomöostase (Wilson, Menkes, Parkinson)<sup>[4–6]</sup> in Verbindung gebracht. Es ist ersichtlich, dass die Kenntnis der lokalen, temporalen und funktionalen Kupferkonzentrationen einen erheblichen Anteil an der Aufklärung der zellulären Prozesse bei vielen pathologischen Vorgängen haben wird.<sup>[7]</sup>

Zur Bestimmung von Kupferkonzentrationen in Zellen und Organismen existiert eine Fülle von Verfahren.<sup>[8]</sup> Viele dieser Methoden leiden jedoch unter erheblichen Nachteilen. Oft können nur totale Kupferkonzentrationen gemessen werden; die biologischen Proben müssen zur Untersuchung zerstört werden oder können nicht unter physiologischen Bedingungen untersucht werden. Auch die maximale räumliche Auflösung der Verfahren lässt in vielen Fällen zu wünschen übrig und reicht nicht bis in den subzellulären Bereich hinein.

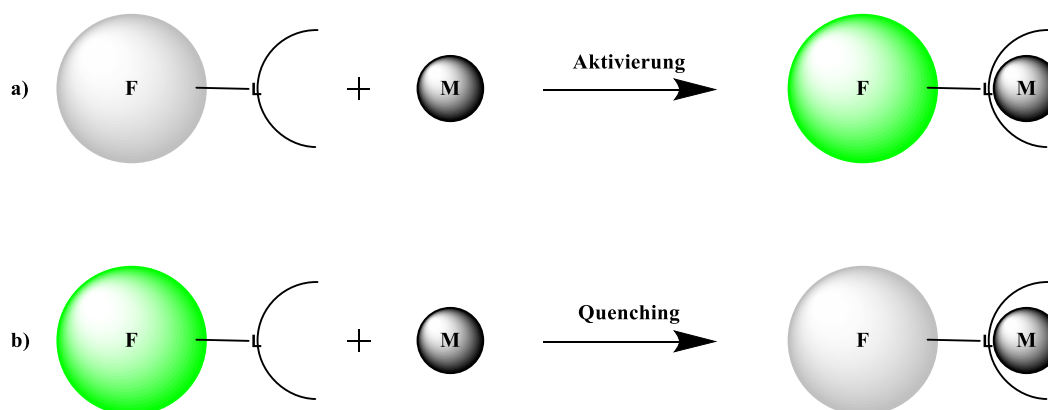
## 1.2 Fluoreszenzsonden und Reporter

Diesen zuvor genannten Problemen kann mit Hilfe von fluoreszenten Sonden und Reportern Abhilfe geschaffen werden. Kombiniert mit modernsten optischen Mikroskopie- und Spektroskopie-Techniken, lassen sich nicht nur Metallkonzentrationen<sup>[9]</sup>, sondern auch der pH-Wert<sup>[10]</sup>, Redoxpotentiale<sup>[11]</sup>, Enzymaktivitäten<sup>[12]</sup>, zelluläre Strukturen und Mechanismen mit einer Auflösung bis 30 nm sichtbar machen.<sup>[13,14]</sup> Die Fluoreszenzmikroskopie ist sogar so leistungsfähig, dass sie es dem Anwender ermöglicht, einzelne Moleküle zu selektieren und ihr Verhalten zu studieren. Sei es beispielsweise an rein chemischen Systemen wie bei Wirtz *et al.*<sup>[15–17]</sup> oder aber *in-vivo* an einzelnen Zellen<sup>[18,19]</sup> und sogar an ganzen Organismen.<sup>[20,21]</sup>

Ein fluoreszenter Metallsensor besteht in der Regel aus zwei Einheiten: dem Fluorophor, also einem fluoreszierenden Molekül, und einem Liganden zur Komplexbildung des Metallions.<sup>[22]</sup> Sondenmoleküle, die ihre optischen Eigenschaften, wie die Fluoreszenz, aufgrund von direkten chemischen Reaktionen mit einem Metallion ändern, sollen hier nur am Rande erwähnt werden. Eine solche Sonde haben beispielsweise Dujols *et al.*<sup>[23]</sup> und Swamy *et al.*<sup>[24]</sup> synthetisiert. Die Sonde besteht aus einem nicht fluoreszierenden Rhodamin-Derivat mit einer Hydrazidfunktion. Diese Hydrazidfunktionen können in wässriger Lösung durch eine Cu(II)-Kationen katalysierte Hydrolyse gespalten werden und so ein fluoreszierendes Rhodamin-Derivat freisetzen. Für weitere Beispiele sei auf entsprechende Literaturstellen verwiesen.<sup>[15,16,25]</sup>

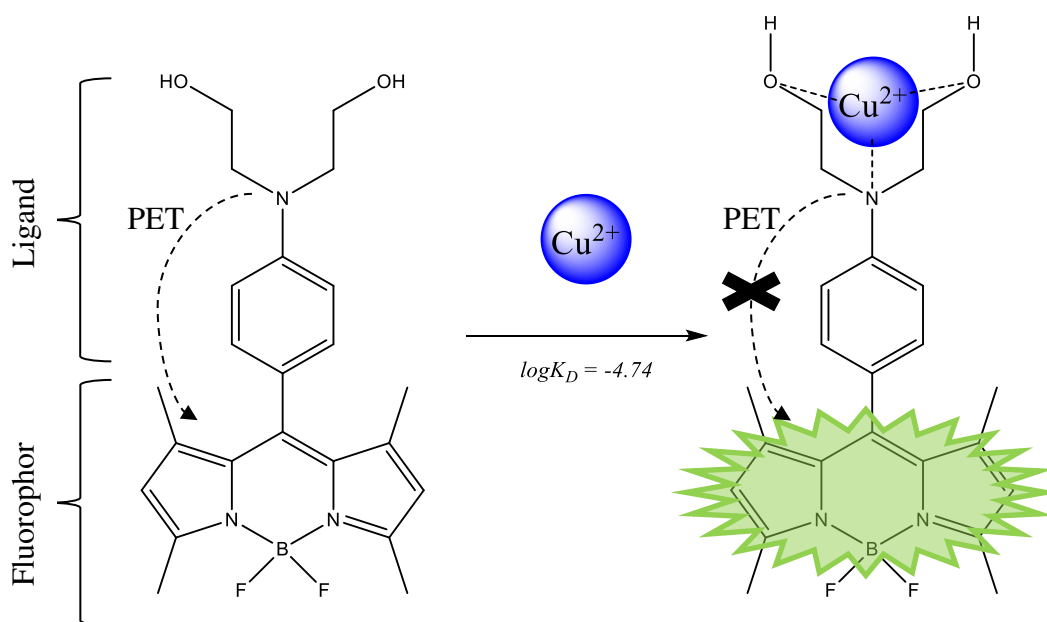
Wird nun ein Metallkation von einem geeigneten Sensor komplexiert, kann es entweder zu einer Aktivierung der Fluoreszenz (turn-on Sensor) oder zur Fluoreszenzlöschung, sog. Quenching (turn-off Sensor), kommen. Abbildung 1-1 verdeutlicht dieses Prinzip.





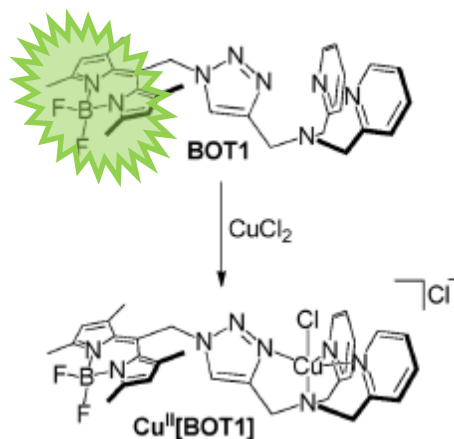
**Abbildung 1-1** Das Prinzip eines a) turn-on-Sensors und eines b) turn-off-Sensors (F-Fluorophor, L-Ligand, M-Metall)

Die Mechanismen, nach denen o.g. Sensoren funktionieren, basieren vor allem auf zwei photophysikalischen Prozessen, dem lichtinduzierten Elektronentransfer (PET) und dem Förster-Resonanztransfer (FRET). PET beruht auf einem Redoxprozess zwischen dem Liganden und dem Fluorophor.<sup>[26]</sup> Es wird zwischen reduktivem und oxidativem PET unterschieden, und beide Mechanismen finden Anwendung bei turn-off respektive turn-on Sensoren. Reduktiver PET tritt auf, wenn ein elektronenreicher Ligand ein Elektron aus seinem höchsten besetzten Molekülorbital (HOMO) auf das energieärmere einfach-besetzte HOMO eines elektronisch angeregten Fluorophors überträgt. Dadurch ist es dem angeregten Molekül nicht mehr möglich unter Photonenemission (Fluoreszenz) in den Grundzustand zurückzukehren. Bindet der Ligand nun ein Metallion, so wird die Energie des Liganden-HOMO abgesenkt und die Ratenkonstante des PET nimmt ab, was wiederum in einer Zunahme der Fluoreszenzrate resultiert (s. Abbildung 1-4 a)). Untenstehende Abbildung 1-2 zeigt einen in der Literatur<sup>[27]</sup> beschriebenen turn-on-Sensor für Kupfer(II)-Ionen, bei dem die Fluoreszenz des BODIPY-Fluorophors nach Komplexierung des Zielmoleküls wieder hergestellt ist.



**Abbildung 1-2** Beispiel für einen  $\text{Cu}^{2+}$ -turn-on-Sensor basierend auf reduktivem PET synthetisiert von Qi *et al.*<sup>[27]</sup> Nach der Komplexbildung des Kupfer(II)-Ions durch den Liganden wird der PET-Prozess unterdrückt und es kommt zur Aktivierung der Fluoreszenz des BODIPY-Fluorophors. Die Dissoziationskonstante des gebildeten Komplexes liegt bei  $K_D = 18 \mu\text{M}$  ( $\log K_D = -4.74$ ).

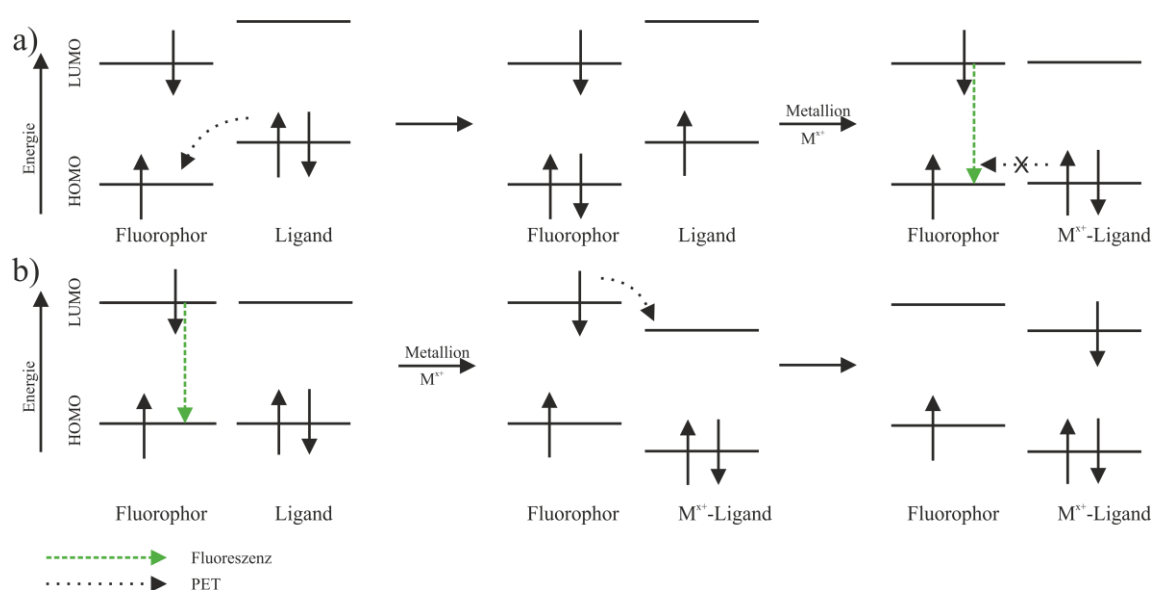
Neben reduktivem PET für turn-on Sensoren<sup>[27–31]</sup> gibt es auch einige Beispiele für turn-off Sensoren basierend auf oxidativem PET.<sup>[32–35]</sup>



**Abbildung 1-3** Nach der Komplexbildung von Kupfer(II)-Ionen erlischt die Fluoreszenz des von Rosenthal *et al.* synthetisierten BOT1 Farbstoffes durch oxidativen PET. Die Dissoziationskonstante des  $\text{Cu}^{\text{II}}[\text{BOT1}]$ -Komplexes beträgt  $K_D = 3.0 \pm 0.1 \mu\text{M}$  ( $\log K_D = -5.52 \pm 0.01$ ). Abbildung entnommen und modifiziert von Rosenthal *et al.*<sup>[33]</sup>

Das HOMO des Liganden befindet sich in diesem Fall energetisch auf einem niedrigeren Niveau als das des Fluorophors. Kommt es nun zur Koordination des Liganden an ein Metallion so wird dem Liganden Elektronendichte entzogen und dessen niedrigstes unbesetzte Molekülorbital (LUMO) energetisch abgesenkt. Die Metallbindung öffnet also

einen zusätzlichen nicht-strahlenden Relaxationskanal und das angeregte Elektron des Fluorophors kann aus seinem LUMO auf das LUMO des Liganden übertragen werden. Somit kann es zu keiner strahlenden Desaktivierung des angeregten Fluorophors kommen und die Fluoreszenz wird gelöscht (s. Abbildung 1-4 b)). In Abbildung 1-3 ist ein solcher turn-off-Sensor für Kupfer(II)-Ionen gezeigt. Durch die Komplexbildung des Kupfer(II)-Kations wird der oxidative PET induziert und die Fluoreszenz nimmt um das 12-fache ab.<sup>[33]</sup>



**Abbildung 1-4** Mechanismen des a) reduktiven PET und des b) oxidativen PET

Der zweite wichtige Mechanismus, der Förster-Resonanzenergietransfer FRET, beruht auf einer strahlungslosen Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen einem angeregtem Donor  $D^*$  und einem geeigneten Akzeptor A. Dieser Akzeptor kann sowohl selbst ein Fluorophor sein, aber auch ein anderer Farbstoff<sup>[36]</sup> oder ein farbiger Metallkomplex.<sup>[37–41]</sup> Voraussetzung für FRET ist es, dass das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt und die  $D^*$ -A-Abstände ca 1-10 nm betragen. Die Folge von FRET ist eine Abnahme der Donoremission und in einigen Fällen eine simultane Zunahme der Akzeptoremission. So können auch auf FRET basierende Sensoren sowohl als turn-off als auch als turn-on Sensoren fungieren.

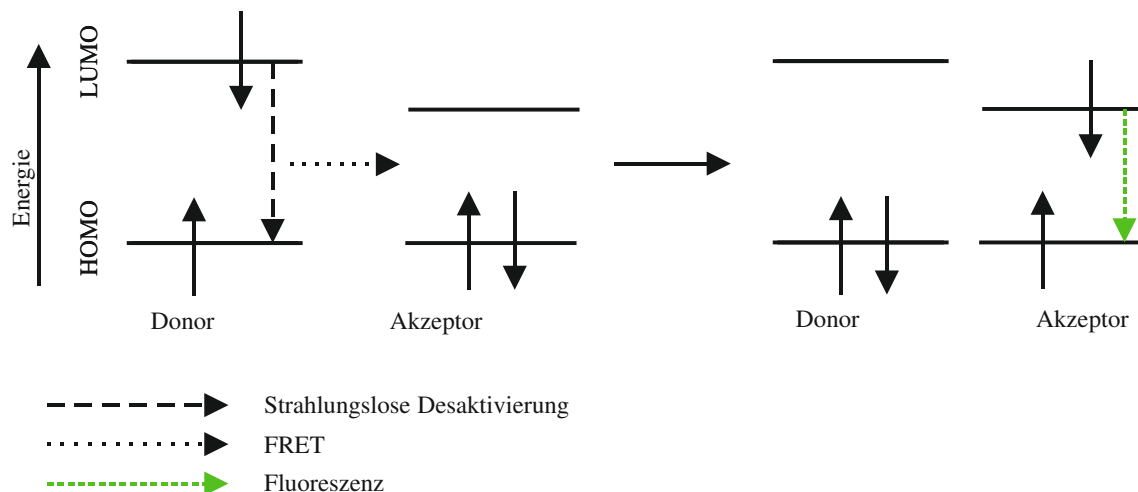


Abbildung 1-5 FRET-Mechanismus

Ein wichtiger Aspekt für die *in-vivo* Quantifizierung von Kupferionen ist, dass die nach den o.g. Prinzipien synthetisierten Sensoren selbst referenzierend und selektiv gegenüber Kupfer sind. Das Innere von Zellen und Organismen stellt eine extrem inhomogene Umgebung für Ligand-Fluorophor Systeme dar. So können die Sensoren beispielsweise in unpolaren Membranen aggregieren oder etwa mit anderen Zellbestandteilen wie Metaboliten, Proteinen und anderen Übergangsmetallen reagieren. Um letztere Probleme zu beseitigen, muss die Selektivität des Sensors gegenüber dem Analyt verbessert werden. Probleme wie Aggregation oder lokale Unterschiede in der Sensorkonzentration erlauben es bei Sensoren, die beispielsweise extern kalibriert werden müssen, nur eine qualitative Aussage über Analytkonzentrationen zu machen. Erst die selbst referenzierenden Sensoren, basierend auf Fluoreszenzintensitätsverhältnissen (ratiometrisch)<sup>[42]</sup> oder der Fluoreszenzlebensdauer, ermöglichen eine quantitative Bestimmung von Metallkationen.<sup>[43]</sup>

## 1.3 Motivation

Kupferproteine und Chaperone besitzen extrem hohe Affinitäten gegenüber Kupfer (s. Tabelle 1-1), weshalb intrazelluläre Kupferkonzentrationen extrem stark gepuffert sind und es, im Grunde, keine freien Kupferpools in Zellen gibt.<sup>[44]</sup>

**Tabelle 1-1** Überblick einiger ausgewählter Kupferproteine und Chaperone sowie deren Dissoziationskonstanten.

Kupferprotein/Kupferchaperon	$\log K_D$
Cu/Zn-Superoxid-Dismutase – SOD1	-14.22 <sup>[44]</sup>
ATOX1	-13.8 <sup>[45]</sup>
Humanalbumin – HSA	-12.0 <sup>[46]</sup>
Human Copper Importer – Ctr1	-14 <sup>[47]</sup>

In pathologisch veränderten Zellen können jedoch freie intrazelluläre Kupferkonzentrationen vorliegen, welche dann mit Hilfe von Fluoreszenzsensoren bestimmt werden können.<sup>[48]</sup> Da die eingebrachten Sensorkonzentrationen maximal im nanomolaren Bereich liegen, ist es notwendig, gleichzeitig die Konzentration von freiem Liganden sowie dem Ligand-Metall-Komplex zu bestimmen, da die Gleichgewichtsbeeinflussung durch das Massenwirkungsgesetz nicht mehr vernachlässigt werden kann. Dies kann mit modernen Methoden der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) bewerkstelligt werden. Die FCS ist ein Verfahren, das die Intensitätsfluktuationen eines diffundierenden Fluorophors durch ein festgelegtes Volumen (ca.  $10^{-15}\text{L}$ ) autokorreliert. Dadurch können Aussagen über photophysikalische Parameter, Diffusionsverhalten und Fluorophorkonzentrationen getroffen werden.<sup>[49]</sup> Auch kann die FCS mit anderen Mikroskopie-<sup>[50–52]</sup> und Spektroskopie-Techniken<sup>[53,54]</sup> verknüpft werden. So gibt es beispielsweise Verfahren, wie die Fluoreszenzlebensdauerkorrelationsspektroskopie (FLCS)<sup>[53,55]</sup>, die auf der Verwendung von statistischen Filtern beruhen. Hier wird jedem detektierten Photon ein zusätzlicher Wert zugeordnet, der mit der Fluoreszenzlebensdauer der emittierenden Spezies assoziiert ist. Dadurch können speziesspezifische Autokorrelationsfunktionen erzeugt und über diese die absoluten Konzentrationen zweier Fluorophore simultan gemessen werden. Da sich die Spezies nur in ihrer Fluoreszenzlebensdauer unterscheiden müssen, können die

Konzentrationen von freiem Ligand und dem Ligand-Metall-Komplex gleichzeitig bestimmt werden, sofern der Löschprozess der Fluoreszenz mit einer Änderung der Fluoreszenzlebensdauer einhergeht.

Das Ziel dieser Arbeit liegt also auf der Entwicklung eines hochaffinen Kupfer(II)-Sensors, welcher aufgrund von FRET in Anwesenheit der Kupfer(II)-Ionen seine Fluoreszenzlebensdauer ändert. Die Bindung des Sensors zu den Kupfer(II)-Ionen soll dadurch mit der FLCS nachverfolgt werden, um so in extrem geringen Konzentrationsbereichen, in denen die Ligandkonzentration in das Analytgleichgewicht eingreift, sowohl den freien Ligand als auch den Ligand-Metallion-Komplex zu quantifizieren.

## 1.4 Aufbau der Arbeit

Der Aufbau der vorliegenden Arbeit gliedert sich in fünf Teile. Im ersten (auf die Einleitung folgenden Teil) werden die biologische Rolle von Kupfer, die theoretischen Grundlagen der Messmethodik und das Design des Targetmoleküls betrachtet. Der zweite Teil der Thesis beschäftigt sich mit den verwendeten experimentellen Aufbauten und der Synthese des Kupfer(II)-Sensors. Die Präsentation, Auswertung und kritische Diskussion der Ergebnisse findet im dritten Teil statt, bevor im vierten und fünften Abschnitt die Dissertation zusammengefasst und ein möglicher Ausblick über die Zukunft der vorgestellten Thematik gegeben wird.

## 2 Theorie

### 2.1 Die biologische Rolle von Kupfer in eukaryotischen Zellen

Kupfer gehört wohl zu den vielseitigsten Metallen, die von eukaryotischen Zellen genutzt werden, aber auch zu den Metallen, dessen Homöostase am stringentesten kontrolliert werden muss, denn nur geringste Störungen derselben können zu schwerwiegenden pathologischen Veränderungen führen.

Wie eingangs schon erwähnt, ist die Eigenschaft, die für Eukaryoten am wichtigsten ist, die Fähigkeit von Kupfer in zwei verschiedenen Redoxzuständen zu existieren, nämlich  $\text{Cu}^+$  und  $\text{Cu}^{2+}$ . Diese Funktion liefert schon den ersten Grund für eine genaue Regulierung der Kupferhomöostase, da im freien Cytoplasma Kupfer in einer Fenton-ähnlichen Reaktion die Bildung von RO-Spezies (allen voran das hochaggressive Hydroxylradikal  $\text{OH}^\bullet$ ) sowie von RN-Spezies (*reactive nitrogen species*) katalysieren kann.<sup>[56–58]</sup> Hohe Level solcher Radikale werden mit einer Vielzahl von Krankheiten wie der Entstehung von Krebs<sup>[59–62]</sup>, oder neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer (AD)<sup>[63–65]</sup> und Parkinson (PD)<sup>[66,67]</sup> sowie der (familiären) amyotrophen Lateralsklerose ((f)ALS)<sup>[2,68–70]</sup> in Verbindung gebracht.<sup>[71–73]</sup> Unreguliertes freies Kupfer ist auch in der Lage, in seinen beiden Redoxzuständen, an verschiedene Enzyme und Proteine zu binden. So besitzt Kupfer(I) eine hohe Affinität gegenüber Cystein und kann an entsprechende Proteine und Enzyme binden und diese in ihrer Funktion stören. Kupfer(II) hingegen ist in der Lage – entsprechend seiner Stellung in der Irving-Williams-Reihe – Metalle wie zum Beispiel  $\text{Zn}^{2+}$  aus den aktiven Zentren von Enzymen zu verdrängen und somit die Enzymaktivität zu beeinflussen.<sup>[73]</sup> Weiter können freie Kupferionen die Aggregation von Proteinen und die Fibrillenbildung fördern, welche mit einigen der o.g. neurodegenerativen Krankheiten zusammenhängen.<sup>[3,57,74]</sup>

Nicht nur eine zu hohe Anwesenheit von Kupfer kann die eukaryotischen Zellen schädigen, sondern auch eine Unterversorgung der Zellen mit Kupfer. Beispielsweise kann bei Patienten mit Menkes-Syndrom Kupfer nicht genügend aus der Nahrung resorbiert werden und auch nicht genügend über die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden. Infolgedessen leiden Patienten mit Menkes unter anderem an starken neurologischen Defiziten

und erreichen daher kaum – auch bei entsprechender parenteraler Kupfer-Versorgung – das Erwachsenenalter.<sup>[4,75]</sup>

Dies zeigt die extreme Wichtigkeit eines streng regulierten Kupferhaushaltes in Zellen. Daher soll in den nachfolgenden Abschnitten kurz auf die biologische Bedeutsamkeit des essentiellen Spurenelements Kupfer eingegangen werden, indem die Rolle und Funktion, die Aufrechterhaltung der Kupferhomöostase sowie die aus einer dysfunktionalen Homöostase resultierenden pathologischen Prozesse betrachtet werden.

### 2.1.1 Die Rolle und Funktion von Kupfer

Die Eigenschaft zwischen seiner reduzierten  $\text{Cu}^+$  und seiner oxidierten  $\text{Cu}^{2+}$ -Form hin und her zu wechseln, macht das Element Kupfer zu einem interessanten Cofaktor von Metalloenzymen. Kupfer-Metalloenzyme finden sich vor allem in der Gruppe der Oxidoreduktasen und übernehmen verschiedene Funktionen. So dient beispielsweise das im Zytoplasma vorkommende Enzym Cu/Zn-Superoxid-Dismutase (SOD1) dem Zweck, das extrem aggressive Superoxidanion zu Wasserstoffperoxid umzuwandeln.<sup>[76]</sup> Eine extrem wichtige Rolle spielt Kupfer im letzten Schritt der Atmungskette. Das Enzym Cytochrom-c-oxidase (COX) besitzt zwei Kupfer-Zentren mit insgesamt drei Kupferatomen, die maßgeblich daran beteiligt sind, die notwendigen Elektronen für die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser bereitzustellen.<sup>[77,78]</sup> Es gibt eine weitere Vielzahl von Kupfer-Metalloenzymen, die an wichtigen Prozessen im Körper beteiligt sind. Einen Überblick über einige exemplarische kupferabhängige Proteine findet sich in der Arbeit von Festa und Thiele<sup>[1]</sup>, aus der auch nachfolgende Abbildung entnommen ist.



Table 1. Examples of Cu-dependent proteins and Cu homeostasis proteins.

Protein	Function	Bacteria	Fungi	Animals	Plants
<b>Transcriptional regulators</b>					
Ace1	Transcriptional activation in high Cu conditions		X		
CopY	Bacterial Cu metalloregulatory repressor	X			
CsoR	Bacterial Cu metalloregulatory repressor	X			
Mac1	Transcriptional activator in low Cu conditions		X		
CueR	Bacterial Cu metalloregulatory repressor	X			
Mtf1	Metalloregulatory transcription factor			X	
Spl7	Transcriptional activator responding to Cu deficiency				X
<b>Chaperones/storage</b>					
Atox1	Metallochaperone delivering Cu to P-type ATPases		X	X	X
Ccs	Delivers Cu to the Cu/Zn SOD1		X	X	X
CopZ	Bacterial Cu chaperone	X			
Metallothionein	Low molecular weight, cysteine-rich metal-binding and detoxification	X	X	X	X
<b>Cell surface/secretory compartment transporters and receptors</b>					
P1B-type ATPases	Cu <sup>+</sup> -exporting proteins	X	X	X	X
Ctr	Cu <sup>+</sup> -importing proteins		X	X	X
Ethylene receptor	Uses Cu as a cofactor for ethylene signaling				X
<b>Oxidoreductases</b>					
Ascorbate oxidase	Reduction of L-ascorbate			X	
Dopamine-monoxygenase	Tyrosine metabolism			X	
Galactose oxidase	Reduction of galactose		X		
Amine oxidase	Oxidation of diamines	X	X	X	X
<b>Electron transfer/energy production/blue Cu proteins</b>					
Cytochrome c oxidase	Necessary for the last step of respiration	X	X	X	X
Plastocyanin	Electron transfer during photosynthesis	X			X
NADH dehydrogenase	Electron transfer from NADH to coenzyme Q	X	X	X	X
Nitrite reductase	Reduces nitrite to nitric oxide	X			
Amicyanin	Electron-accepting intermediate in the conversion of methylamine to formaldehyde and ammonia	X			
<b>Free radical scavenging</b>					
Cu/Zn SOD	Free radical scavenging	X	X	X	X
<b>Oxidase</b>					
Laccase	Melanine production	X	X	X	X
Lysyl oxidase	Catalyzes the formation of collagen and elastin precursors, extracellular			X	
Ceruloplasmin	MultiCu oxidase			X	
Hephaestin	Transmembrane ferroxidase, transports iron from the intestine to the circulatory system			X	
Multicopper ferroxidase	Cu-dependent iron uptake		X	X	X
<b>Monoxygenase</b>					
Methane monoxygenase	Oxidizes C-H bond in methane	X			
Phenylalanine hydrolase	Hydroxylation of the aromatic side chain of phenylalanine to generate tyrosine			X	
Tyrosinase	Monophenol monoxygenase, catalyzes the oxidation of phenols, melanin synthesis	X	X	X	X

**Abbildung 2-1** Beispiele für kupferabhängige Proteine und Vorkommen derselben in den Domänen des Lebens. Entnommen aus der Arbeit von Festa und Thiele.<sup>[1]</sup>

Interessanterweise nutzen Zellen Kupfer nicht nur als Cofactor von Enzymen. So konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass Kupfer auch ein wichtiges Molekül für die Zellkommunikation darstellt. Dies ist von besonderer Bedeutung, da bisher die gängige Meinung war, dass nur redoxinaktive Metallionen wie Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> an solchen Prozessen beteiligt sind.<sup>[79]</sup> Verschiedene Arbeitsgruppen und Studien konnten jedoch mittlerweile zeigen, dass es dynamische Kupferpools in Zellen geben muss, die aktiv zelluläre Prozesse regulieren und beeinflussen.<sup>[61,62,80]</sup> So können Neurone beispielsweise unter Stimulation labiles Kupfer entlang ihrer Dendrite relokalisieren und in den synaptischen Spalt abgeben.<sup>[81]</sup> Zellen des Immunsystems nutzen Kupfersignalwege um Infektionen zu bekämpfen. Makrophagen reagieren beispielsweise auf Angriffe durch mikrobielle Infektionen, indem sie den Angreifer (z.b. ein Bakterium oder eine Mikrobe) in ihr

Phagosom aufnehmen und dort „verdauen“.<sup>[82]</sup> Nun konnten Petris *et al.* zeigen, dass als Reaktion auf solche Immunstimuli die Zelle kupferabhängige Ionentransporter an die Phagosom-Membran bringt, was den Schluss nahelegt, dass hier als Antwort auf eine Immunreaktion Kupferionen mobilisiert werden.<sup>[83]</sup> In Krebszellen stellt Kupfer einen wichtigen Regulator für die Tumorzellproliferation dar. Bei Aktivierung des MAPK-Pfades in Tumorzellen dient Kupfer direkt dazu an MEK1/2-Kinase zu binden, was zu Tumorstadium führt.<sup>[84]</sup> Erst kürzlich konnte Kupfer als endogener Regulator für die Lipolyse identifiziert werden, indem es Einfluss auf die Abbauaktivität des sekundären Botenstoffs cyclisches-AMP nimmt.<sup>[79]</sup>

### 2.1.2 Aufrechterhaltung der Kupferhomöostase

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, welche wichtigen Enzymaktivitäten und auch zellulären Signalwege von einer funktionalen Kupferhomöostase abhängen. Dieser Abschnitt soll kurz darauf eingehen, wie Zellen ihren Kupferhaushalt regulieren.<sup>[57,62,85]</sup> Kupfer wird ausschließlich über die Nahrung aufgenommen und gelangt über den Magen und den Zwölffingerdarm in den Blutkreislauf des Körpers. Dort wird es vor allem mit Hilfe der im Blutplasma vorhandenen Ceruplasmine transportiert.<sup>[86]</sup> Außerhalb der Zellen wird nun das Kupfer(II)-Kation mit Hilfe von an der Zellmembran sitzenden Metalloreduktasen zu Kupfer(I) reduziert und über das Kupfertransportprotein Ctr1 in die Zelle gebracht, wo es von Kupferchaperonen wie Atox1 und Ccs sowie kleinen Molekülen wie Glutathion komplexiert und im Cytoplasma transportiert wird. Atox1 bringt das Kupfer zu den ATPasen ATP7A und ATP7B. Diese sind meist am Golgiapparat lokalisiert und beladen dort die Kupferproteine mit Kupfer, können jedoch auch bei hohen intrazellulären Kupferkonzentrationen an die Plasmamembran gebracht werden und dort überschüssiges Kupfer aus der Zelle ausscheiden. Prinzipiell folgen alle Säugetierzelltypen diesem Schema und unterscheiden sich von Zelltyp zu Zelltyp in den Levels der Expression der zugehörigen Chaperone und Kupferproteine oder ATPasen.

Neben dem fest in Chaperonen und Proteinen verankerten Kupfer konnten seit einiger Zeit frei zugängliche Kupferpools in Zellen identifiziert werden. Diese lassen sich schnell und einfach mobilisieren und reagieren auf Zellstimuli wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Der genaue Mechanismus und welche zellulären Bestandteile für die Mobilisierung von freiem Kupfer verantwortlich sind, ist zu diesem Zeitpunkt noch ungeklärt.<sup>[61]</sup>

### 2.1.3 Pathologische Prozesse einer dysfunktionalen Kupferhomöostase

Eine Störung der Kupferhomöostase kann eine Vielzahl von pathologischen Prozessen und Krankheiten auslösen. Nachfolgend sollen beispielhaft einige davon beleuchtet werden. Vor allem in Hinblick auf die Rolle von Kupfer bei neurodegenerativen Erkrankungen soll hier auf einen sehr komplexen Übersichtsartikel von Gaggelli *et al.* verwiesen werden, in welchem alle Facetten der Kupferhomöostase und deren Einfluss auf die besagten Krankheiten ausführlich behandelt werden.<sup>[57]</sup>

#### **Morbus Alzheimer (AD)**<sup>[63–65]</sup>

Morbus Alzheimer ist die am weitesten verbreitete neurodegenerative Krankheit des Menschen. Sie ist gekennzeichnet durch den fortschreitenden irreversiblen Verlust von Erinnerungen, Persönlichkeitsveränderungen und den Rückgang der kognitiven Fähigkeiten. Im Gehirn von Alzheimerpatienten findet man unter anderem extrazelluläre Proteinablagerungen, die sogenannten „senilen plaque“. Dies sind große Ansammlungen von beta-Amyloid (A $\beta$ ). Kupfer kann nun extrem stark an A $\beta$  binden und dort zum einen oxidativen Stress für die Neuronen durch ROS verursachen, zum andern dazu führen, dass A $\beta$  oligomerisiert und sich eben in Form dieser „senile plaque“ ablagert.

#### **Morbus Parkinson (PD)**<sup>[66,67]</sup>

Bei PD handelt es sich um eine degenerative Erkrankung der Motoneuronen, die sich in verschiedenen Einschränkungen der motorischen Fähigkeiten niederschlägt. In den betroffenen Zellen finden sich oft Amyloidfibrillen aus oligomerisiertem  $\alpha$ -Synuclein. Es existieren verschiedene Hypothesen, die die Ausbildung von PD mit einer gestörten Kupferhomöostase in Verbindung bringen. Der genaue Einfluss von Kupfer ist jedoch noch nicht endgültig geklärt.

**Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)**<sup>[2,68–70]</sup>

ALS zeichnet sich durch Verlust und Degeneration der oberen sowie unteren Motoneuronen aus. In vielen Fällen geht die ALS mit einer Mutation der SOD1 einher. Da SOD1 Kupfer in seinem aktiven Zentrum hat, ist ein Zusammenhang mit einer gestörten Kupferhomöostase nicht auszuschließen. Zurzeit werden verschiedene Hypothesen diskutiert, wie es zur Entstehung der ALS kommen kann. Die genauen Ursachen sind aber noch nicht abschließend geklärt und bleiben noch offen.

**Menkes-Syndrom**<sup>[4,75]</sup>

Menkes ist eine Stoffwechselkrankheit, die in einer Kupferunterversorgung resultiert. Auch wenn es schwächere Ausprägungen von Menkes gibt, sterben doch die meisten Menkespatienten in ihrem dritten oder vierten Lebensjahr. Menkes äußert sich in einer fortgeschrittenen geistigen Behinderung und Neurodegeneration. Diese sind eine Folge der extrem geringen Aktivität von Kupferenzymen, die für eine gesunde Hirnentwicklung unabdingbar sind. Beim Menkes-Syndrom ist direkt das Gen betroffen, welches das Protein ATP7A codiert, wodurch die entsprechenden Kupferenzyme nicht mehr mit Kupfer beladen werden können.

**Morbus Wilson**<sup>[87,88]</sup>

Eine weitere bekannte Kupferstoffwechselkrankheit ist Morbus Wilson. Auch hier codiert das betroffene Gen eine ATPase, die für den Kupfertransport zuständig ist. Das führt dazu, dass die Leberzellen, die die Hauptspeicherstelle für Kupfer im Körper darstellen<sup>[73]</sup>, nicht in der Lage sind, Kupfer an die Galle abzugeben und überschüssiges Kupfer über diese auszuscheiden. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation des Kupfers in der Leber und damit einhergehender toxischer Vorgänge wie der Bildung von ROS.

## 2.1.4 Kupfersonden in biologischen Proben

Tabelle 2-1 zeigt einen kleinen Auszug aus der Vielzahl von existierenden fluoreszierenden Sonden für Kupfer(II)- und Kupfer(I)-Kationen. Hier wurden lediglich solche Systeme aufgeführt, die sich schon *in-vivo* in lebenden Zellen bewährt haben. Daneben gibt es noch eine Fülle weiterer fluoreszenter Sonden auf Farbstoff<sup>[28,89–95]</sup>- oder auf Nanopartikelbasis<sup>[96–100]</sup>.

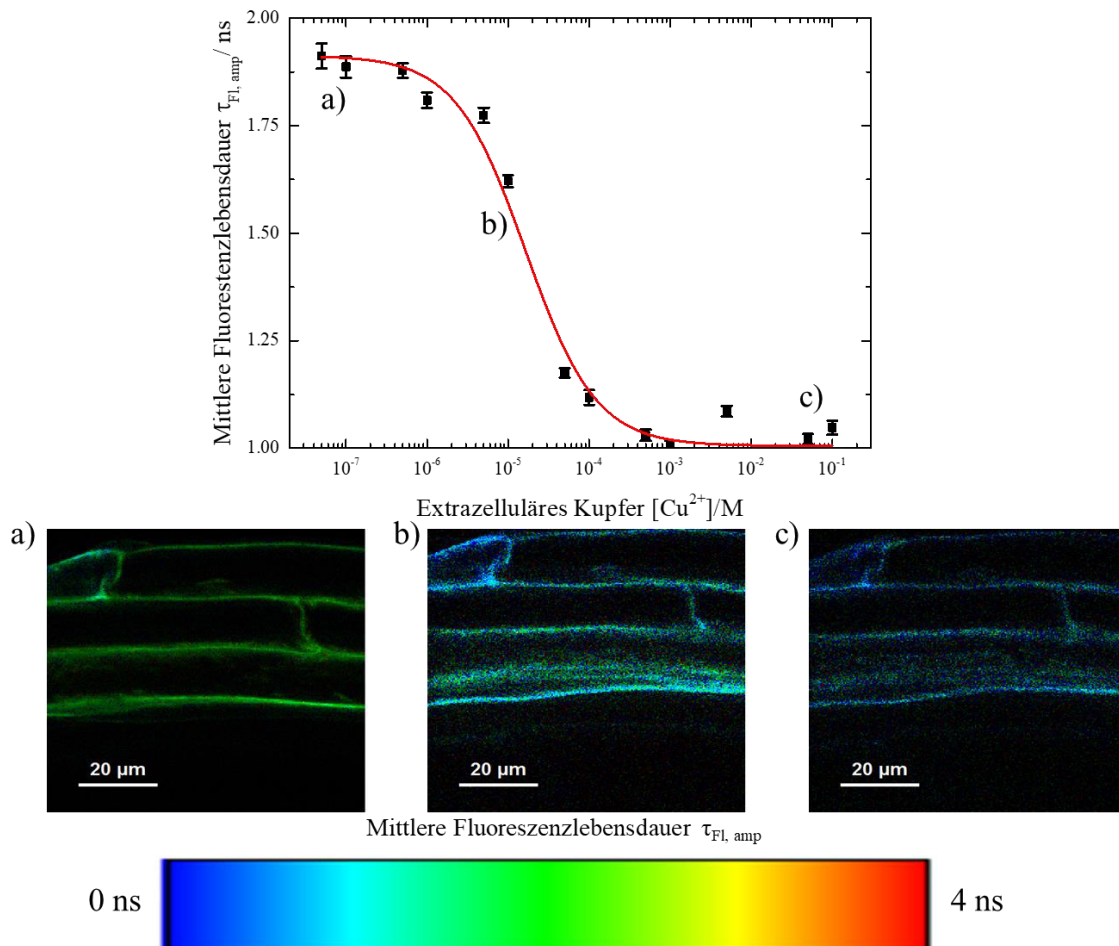
**Tabelle 2-1** Auflistung einiger ausgewählter Sonden für  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ -Kationen samt den ermittelten Dissoziationskonstanten

System	Analyt	Sensormechanismus	Dissoziationskonstante $K_D$
Pyren Chemosensor-1 <sup>[101]</sup>	$\text{Cu}^{2+}$	off-on-PET	364 $\mu\text{M}$
BODIPY-FPA <sup>[102]</sup>	$\text{Cu}^{2+}$	off-on-PET	313 $\mu\text{M}$
His <sub>6</sub> -GFP <sup>[37,38,103]</sup>	$\text{Cu}^{2+}$	on-off FRET <sup>a)</sup>	9 $\pm$ 2 $\mu\text{M}$
NIR-Cy <sup>[104]</sup>	$\text{Cu}^{2+}$	off-on-PET	2.7 $\mu\text{M}$
EGFP(S202H/Q204H) <sup>[41]</sup>	$\text{Cu}^{2+}$	on-off FRET <sup>a)</sup>	16 nM
GCS-2 <sup>[40]</sup>	$\text{Cu}^{2+}$	on-off FRET <sup>a)</sup>	8 nM
Rhodamin-apo-Carboanhydrase <sup>[43]</sup>	$\text{Cu}^{2+}$	on-off FRET <sup>a)</sup>	~0.1 pM
CS1 <sup>[28,105]</sup> , CS3 <sup>[28,81]</sup>	$\text{Cu}^+$	off-on-PET	4 pM (CS1); 90 fM (CS3)
Amt1-FRET <sup>[22,42]</sup>	$\text{Cu}^+$	FRET <sup>b)</sup>	2.5 aM

a) Hier wirkt der entstehende  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex als FRET Akzeptor b) FRET findet zwischen ECFP als Donor und EYFP als Akzeptor statt.

Nachfolgend sollen einige der oben genannten Systeme herausgestellt und näher beschrieben werden. Der in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gregor Jung von Hötzer *et al.* entwickelte Sensor basiert auf einem EGFP (Grün fluoreszierendes Protein) welchem am N-Terminus seiner Fassstruktur ein sogenannter His<sub>6</sub>-Tag anhängig ist. Dies ist ein Hexapeptid bestehend aus 6 Histidinen, welches ursprünglich zur einfacheren und besseren Aufreinigung der GFP Extrakte durch Metallaffinitätschromatographie dient. Die Autoren konnten nun zeigen, dass ebendieser His<sub>6</sub>-Tag in der Lage ist,  $\text{Cu}^{2+}$ -Kationen mit einer  $K_D = 9 \pm 2 \mu\text{M}$  zu binden. Als Resultat des sich ausbildenden  $\text{Cu}^{2+}$ -His<sub>6</sub>-EGFP-Komplexes nimmt die Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzlebensdauer des EGFP durch einen FRET-Mechanismus ab.<sup>[38]</sup> Da es sich um ein genetisch codierbaren Sensor für  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen handelt, konnten Hötzer *et al.* den Sensor in das Erbgut der Pflanzen *Arabidopsis Thaliana* und *Nicotiana Benthiana* einbringen und an den so erzeugten transgenen Pflanzen die Kupfer(II)-Aufnahme durch Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie (FLIM)

visualisieren.<sup>[37]</sup> Aufbauend auf diesen Publikationen konnte als Vorarbeiten für die vorliegende Dissertation eine ganze Titrationskurve in den Wurzelzellen der *Arabidopsis Thaliana* erstellt werden (s. Abbildung 2-2).

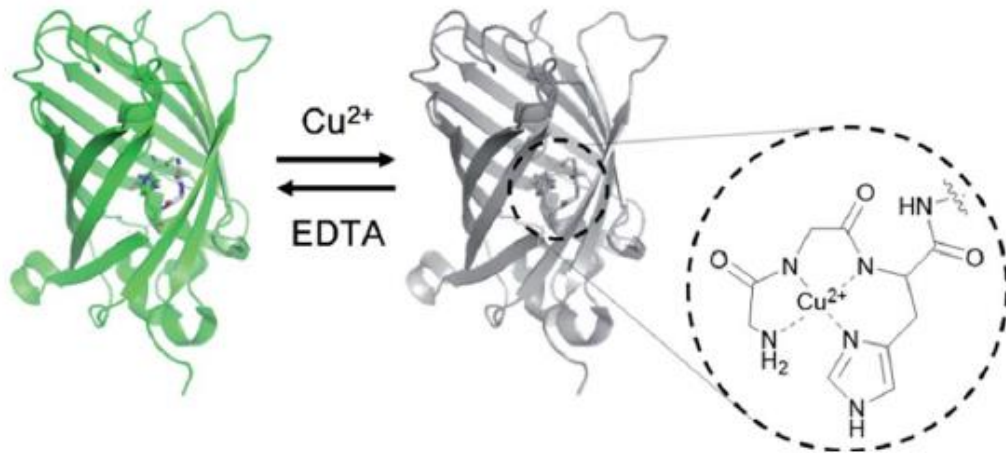


**Abbildung 2-2** Titration einer Wurzel von *Arabidopsis Thaliana* transfiziert mit dem His<sub>6</sub>-EGFP Sensor. Bei Steigerung der extrazellulären Kupferkonzentration nimmt die Fluoreszenzlebensdauer ab. Das Bild a) zeigt die Pflanze bei 50 nM Cu<sup>2+</sup> mit einer mittleren Lebensdauer von 1.9 ns, b) 50  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup> und 1.6 ns sowie c) 0.1 M und 1.1 ns.

Die hier gewonnene Dissoziationskonstante  $K_D = 16 \pm 3 \mu\text{M}$  unterscheidet sich nur unerheblich von der *in-vitro* bestimmten Dissoziationskonstante.

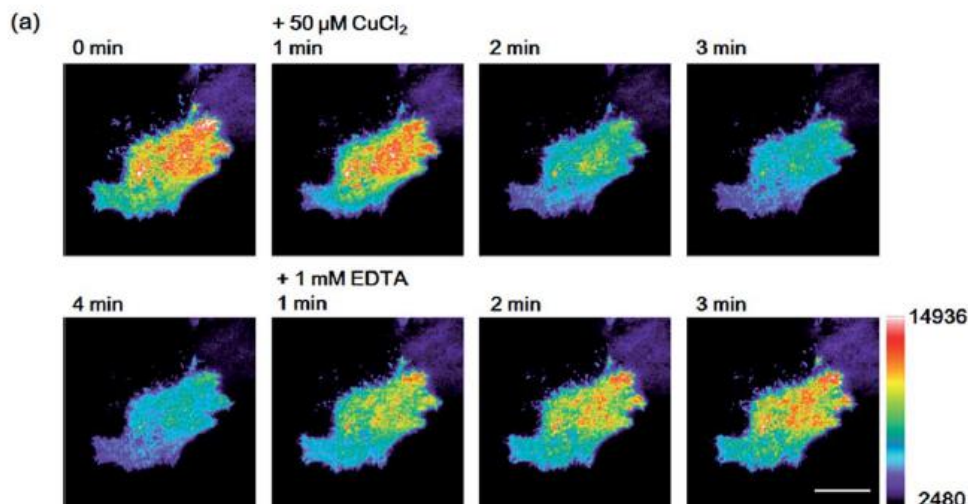
Als Weiterentwicklung des von Hötzer *et al.* vorgestellten Sensors hat die Gruppe um Choi *et al.* die GFP-Variante GCS-2 vorgestellt.<sup>[40]</sup> Die Autoren verfolgten das Ziel, dass GFP Cu<sup>2+</sup>-Ionen um ein vielfaches stärker binden sollte. Um dahin zu gelangen, mutierten sie eine EGFP Variante dahingehend, dass es in der Nähe seines Fluorophors (der bei GFP im inneren seiner Faserstruktur liegt) ein ATCUN-Motiv (s. Abschnitt 2.5) mit einer

hohen Affinität zu  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen besitzt. Der so erhaltene Sensor (s. Abbildung 2-3) hat eine 1000-fach höhere Affinität ( $K_D = 8 \text{ nm}$ ) gegenüber dem His<sub>6</sub>-EGFP.



**Abbildung 2-3** GCS-2 Sensor von Choi *et al.* Der Sensor bindet Kupfer(II)-Ionen an einem ATCUN-Motiv (eingekreiste Strukturformel) in Folge dessen die Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzlebensdauer des GCS-2 abnimmt. Der Prozess ist reversibel und die Fluoreszenz des Sensors kann bei Zugabe von EDTA wiederhergestellt werden. Entnommen aus Choi *et al.*<sup>[40]</sup>

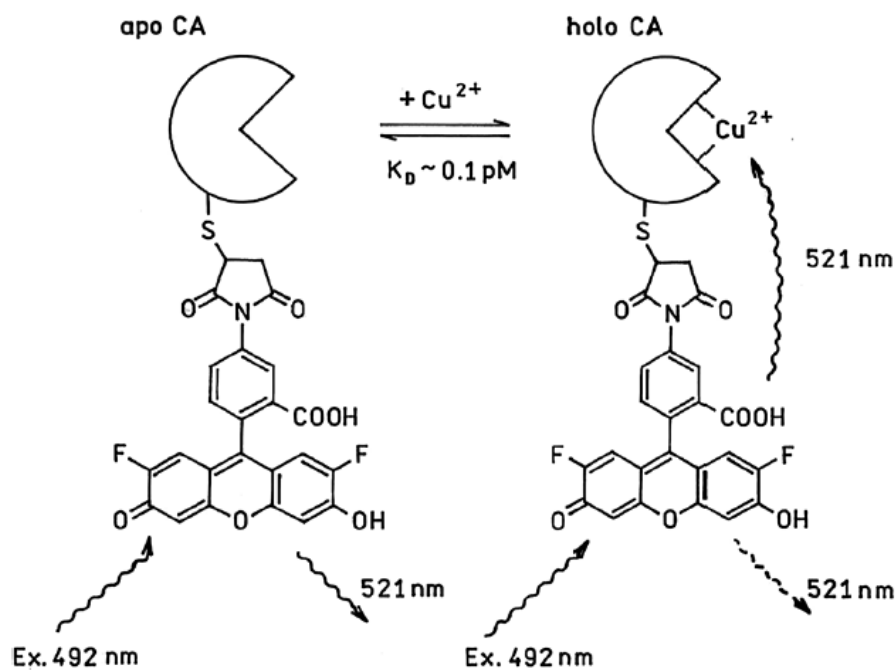
Durch das Erzeugen von Fusionsproteinen konnten die Autoren den Sensor an die Oberfläche von HeLa-Zellen bringen. In einem TIRF Experiment konnten sie nach Zugabe von  $50 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  die Abnahme der Fluoreszenzintensität auf der Zelloberfläche verfolgen (s. Abbildung 2-4)



**Abbildung 2-4** TIRF Aufnahme von HeLa-Zellen, an deren Oberfläche ein GCS-2-Fusionsprotein sitzt und deren Reaktion auf die Zugabe von Kupfer(II)-Ionen und EDTA. Entnommen aus Choi *et al.*<sup>[40]</sup>

Nach der Zugabe von EDTA zu der Zelle konnte die Fluoreszenzintensität wieder fast vollständig hergestellt werden.

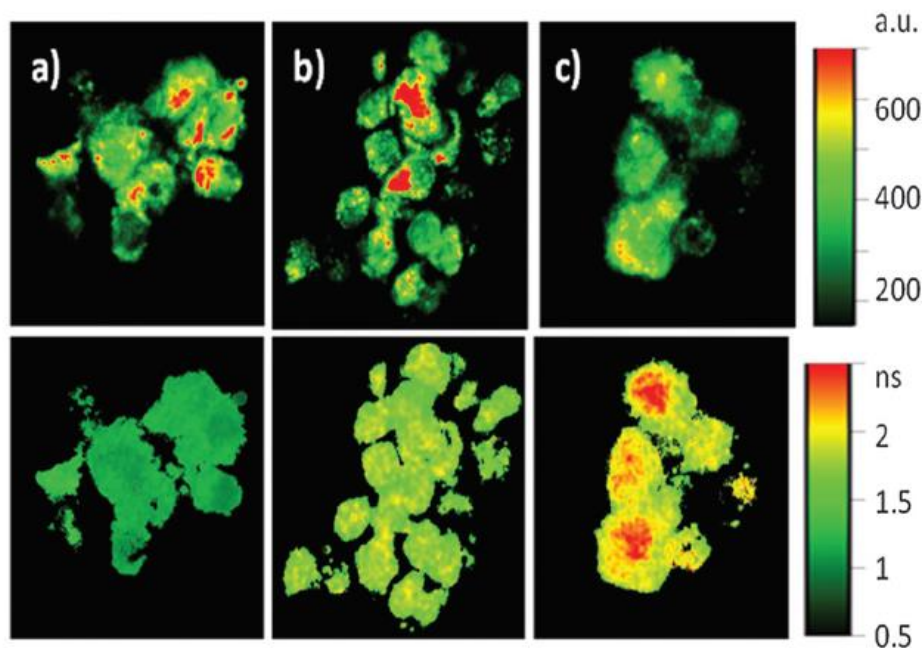
Einen Sensor mit extrem geringer  $K_D \sim 1 \text{ pM}$  entwickelten McCranor *et al.*<sup>[43]</sup> Hierzu entwickelten sie die *apo*-Version einer Carboanhydrase und markierten diese mit einem Rhodamin-Farbstoff. Kupfer(II)-Ionen können nun mit sehr hohen Affinitäten in dem aktiven Zentrum des *apo*-Enzyms binden und über FRET die Fluoreszenz des Rhodamin-Farbstoffes löschen. (s. Abbildung 2-5)



**Abbildung 2-5** Funktionsweise des Rhodamin-Carboanhydrase Kupfer(II)-Sensors. Entnommen aus McCranor *et al.*<sup>[43]</sup>

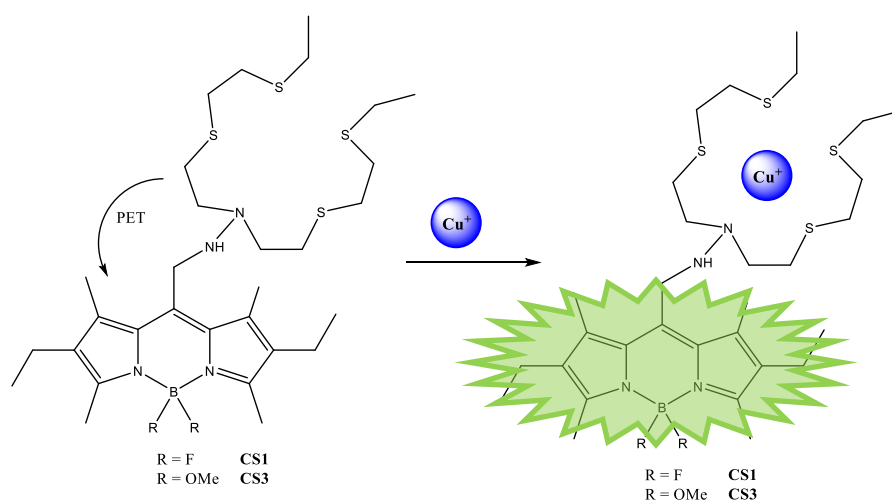
Die Autoren konnten den vorgestellten Sensor in PC-12-Zellen einbringen und dort mit einer Lebensdauer-mikroskopie-Methode die Aufnahme von  $\text{Cu}^{2+}$  visualisieren.





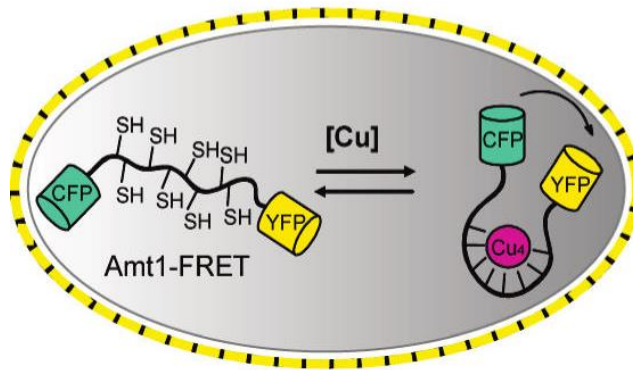
**Abbildung 2-6** Fluoreszenzintensitäts- (obere Reihe) und Fluoreszenzlebensdaueraufnahmen (untere Reihe) von PC-12 Zellen inkubiert mit dem *apo*-CA-Sensor und a) 70 nM b) 10 pM und c) 0.9 fM an Kupfer(II)-Kationen.

Die in Tabelle 2-1 aufgeführten Sensoren für  $\text{Cu}^+$ -Kationen sollen nur kurz am Rande erwähnt werden und auf ausführliche Übersichtsartikel von Aron *et al.*<sup>[28]</sup>, Cotruvo *et al.*<sup>[91]</sup> und Carter *et al.*<sup>[22]</sup> verwiesen werden. Bei dem Sensor CS1 und seiner Weiterentwicklung CS3 handelt es sich um kleine Bodipy-Farbstoffe mit einer Thioether-Gruppe als  $\text{Cu}^+$ -Ligand. Bindet der Sensor  $\text{Cu}^+$  wird der PET vom Liganden auf den Farbstoff unterdrückt und die Fluoreszenz des Farbstoffes nimmt zu.



**Abbildung 2-7** Struktur und Funktionsweise des CS1 und CS3 Kupfer(I)-Sensors.

Bei dem Amt1-FRET-Sensor handelt es sich um ein Fusionsprotein aus ECFP (Cyan fluoreszierendes Protein) und EYFP (Gelb fluoreszierendes Protein) verbunden über eine Cysteinbrücke. Bei Bindung von  $\text{Cu}^+$  an das Konstrukt werden die beiden fluoreszierenden Proteine in räumliche Nähe zueinander gebracht und bilden das ECFP/EYFP-FRET Paar. Dieses Konstrukt besitzt eine extrem hohe Affinität zu  $\text{Cu}^+$  von  $K_D = 2.5 \times 10^{-18} \text{ M}$   $= 2.5 \text{ aM}$ .



**Abbildung 2-8** Funktionsweise des Amt1-FRET-Sensors für Kupfer(I)-Kationen. Entnommen aus Wegner *et al.*<sup>[42]</sup>

## 2.2 Wechselwirkung Licht-Materie

Elektromagnetische Wellen lassen sich anhand ihrer Energie im elektromagnetischen Spektrum anordnen. Der Zusammenhang zwischen der Wellenlänge bzw. Frequenz einer elektromagnetischen Welle und seiner Energie ist über Gleichung (2.1) gegeben.

$$E = h\nu = h\frac{c}{\lambda} \quad (2.1)$$

Der sichtbare Teil des elektromagnetischen Spektrums erstreckt sich von ca. 400-700 nm. In diesem Wellenlängenbereich finden vor allem – neben Streuphänomenen – Anregungen der energiereichsten Elektronen eines Atoms oder Moleküls statt. In diesem Kapitel sollen die für das Phänomen der Fluoreszenz verantwortlichen Prozesse näher beleuchtet und beschrieben werden.

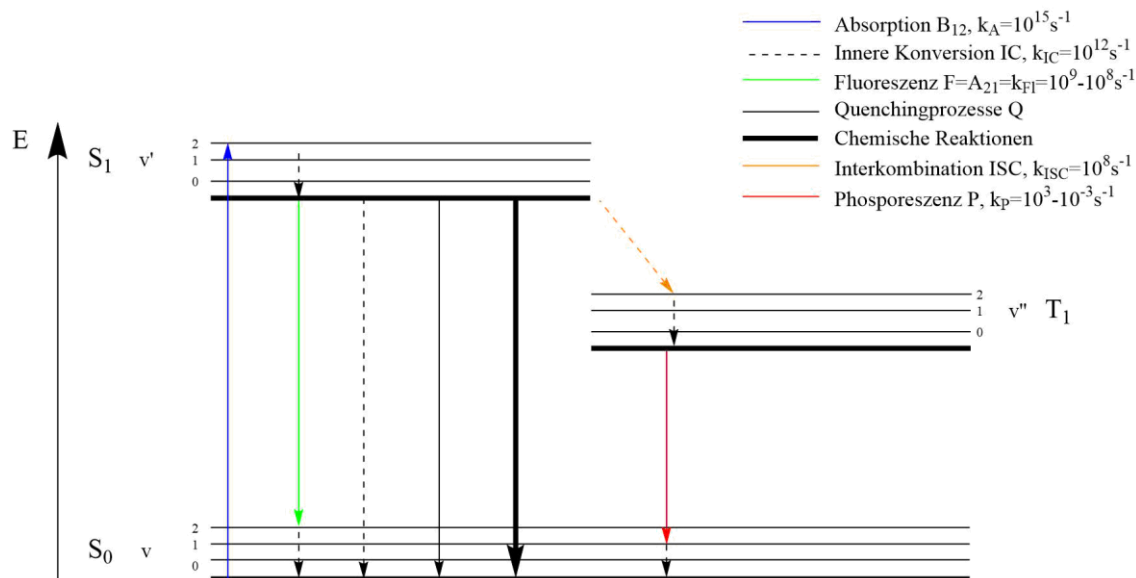
### 2.2.1 Lichtabsorption und Folgeprozesse

Moleküle, die sichtbares Licht absorbieren, besitzen meist ein ausgeprägtes System von konjugierten  $\pi$ -Bindungen. Dieses  $\pi$ -System verändert die elektronische Orbitalstruktur eines Moleküls dahingehend, dass der energetische Abstand zwischen dem HOMO und dem LUMO näher zusammenrückt. Die Energie, die nun einem Elektron zugeführt werden muss, damit es von seinem  $S_0$ -Grundzustand des HOMOs in den ersten angeregten elektronischen Zustand  $S_1$  des LUMOs wechselt, kann nun durch elektromagnetische Wellen im sichtbaren Teil des Spektrums aufgebracht werden. In Molekülen handelt es sich meist um  $\pi \rightarrow \pi^*$ - bzw. um  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge. Neben der sogenannten Resonanzbedingung, die die notwendige Energie als Differenz der Energien von  $S_1$  zu  $S_0$  (s. Gleichung (2.2)), für die Absorption von Licht wiedergibt, müssen noch zwei weitere Bedingungen erfüllt werden, damit es überhaupt zu einer erfolgreichen Absorption kommen kann.

$$\Delta E = E_{S_1} - E_{S_0} \quad (2.2)$$

Das Übergangsdipolmoment  $\vec{\mu}_{ab}$  des Übergangs darf nicht null werden. Die Polarisation des eingestrahlten Lichts muss eine Komponente parallel zum Übergangsdipolmoment des Moleküls besitzen.

Vereinfacht lässt sich der Prozess der Absorption und seine Folgeprozesse in einem sogenannten Jablonski-Diagramm<sup>[106]</sup> darstellen.



**Abbildung 2-9** Jablonski-Diagramm zur Darstellung aller Prozesse, die mit einer mit einer Änderung der elektronischen Energieniveaus eines Moleküls einhergehen.

Nach der energetischen Anhebung eines Elektrons in den ersten angeregten Zustand, strebt das Molekül dazu, wieder den Zustand geringster Energie einzunehmen und die aufgenommene Energie abzugeben. Dabei kann es zu verschiedenen nachgelagerten Prozessen<sup>[107]</sup> kommen: die Energie kann

- für verschiedene chemische Reaktionen zur Verfügung stehen; beispielsweise kann es zu *cis-trans*-Isomerisierungen<sup>[108–110]</sup> oder photolytischen Decarboxylierungen<sup>[111–113]</sup> kommen.
- durch Löschprozesse, also Stöße mit andern Molekülen dissipiert werden.
- durch Innere Konversion (*inner conversion, IC*) als Schwingung an die Umgebung, z.b. das Lösemittel, abgegeben werden.
- durch Interkombination (*inter system crossing, ISC*) dazu benutzt werden, den Spin des Elektrons umzukehren und das Molekül in einen Triplett-Zustand zu bringen.

- durch strahlungslosen Energietransfer FRET auf ein anderes Molekül übertragen werden.
- zu guter Letzt durch stimulierte bzw. spontane Emission (Fluoreszenz) von Photonen abgegeben werden.

Alle oben beschriebenen Prozesse können durch Ratenkonstanten  $k$  beschrieben werden; typische Größen für diese Konstanten sind in Abbildung 2-9 gezeigt. Zur Beschreibung der Ratenkonstanten der Absorption und der stimulierten bzw. spontanen Emission können die von Albert Einstein 1917 eingeführten Einsteinkoeffizienten<sup>[114]</sup> verwendet werden. Im Allgemeinen sind die Ratenkonstanten für die Absorption  $B_{12}$  sowie für die stimulierte Emission  $B_{21}$  gleichzusetzen.

$$B_{12} = B_{21} \quad (2.3)$$

Für den spontanen Emissionsprozess  $A_{21}$ , die sogenannte Fluoreszenz, verhält es sich jedoch anders, hier gilt folgender Zusammenhang zwischen den Einsteinfaktoren.

$$A_{21} = k_{rad} = \tau_{rad}^{-1} = \frac{8\pi h \nu^3}{c^3} B_{21} \quad (2.4)$$

Das bedeutet, dass  $A_{21}$  direkt der Ratenkonstante für die Fluoreszenz  $k_{rad}$  entspricht, und proportional zur Absorption bzw. stimulierten Emission ist. Weiter folgt aus obiger Formel, dass der Kehrwert von  $A_{21}$  direkt der natürlichen Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{rad}$  entspricht und dass, je länger die Wellenlänge des absorbierten Lichtes ist, die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten der spontanen Emission sinkt.

Die natürliche Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{rad}$  bezeichnet die Zeit, die ein Fluorophor im zeitlichen Mittel in seinem angeregten Zustand verbringt bevor er unter Emission eines energieärmeren Photons in den Grundzustand zurückkehrt. Bestimmen lässt sich  $\tau_{rad}$  bzw.  $A_{21}$  mit Hilfe der Strickler-Berg-Gleichung<sup>[115]</sup> aus dem Absorptions- und Emissionsspektrum des Fluorophors.

$$A_{21} = \frac{8\pi n_0^2 \ln(10)}{c^2 N_A} \langle \nu^{-3} \rangle^{-1} \int \frac{\varepsilon(\nu)}{\nu} d\nu \quad (2.5)$$

Mit

$$\langle \nu^{-3} \rangle^{-1} = \frac{\int I_{Fl}(\nu) d\nu}{\int \frac{I_{Fl}(\nu)}{\nu^3} d\nu} \quad (2.6)$$

Beim Vergleich der so gewonnenen natürlichen Fluoreszenzdauern  $\tau_{rad}$  mit den experimentell ermittelten Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_{Fl}$  (s. Abschnitt 2.3) kann es teilweise zu erheblichen Differenzen kommen. Der Grund für diese Abweichungen liegt darin, dass bei der Messung der Lebensdauer alle Prozesse gemessen werden, die den angeregten Zuständen depopulieren. Das bedeutet, es werden auch Löschprozesse, d.h. nicht strahlenden Desaktivierungsvorgänge gemessen. Diese Prozesse wiederum besitzen unterschiedliche Ratenkonstanten, die sich in der Ratenkonstante für nicht strahlende Vorgänge  $k_{ns}$  zusammenfassen lassen, die zur Fluoreszenzlebensdauer beitragen.

$$\tau_{Fl} = \frac{1}{k_{rad} + k_{ns}} \quad (2.7)$$

Der Faktor um den die gemessene und natürliche Lebensdauer voneinander abweichen wird Quantenausbeute  $\Phi$  genannt.

$$\tau_{fl} = \Phi \tau_{rad} \quad (2.8)$$

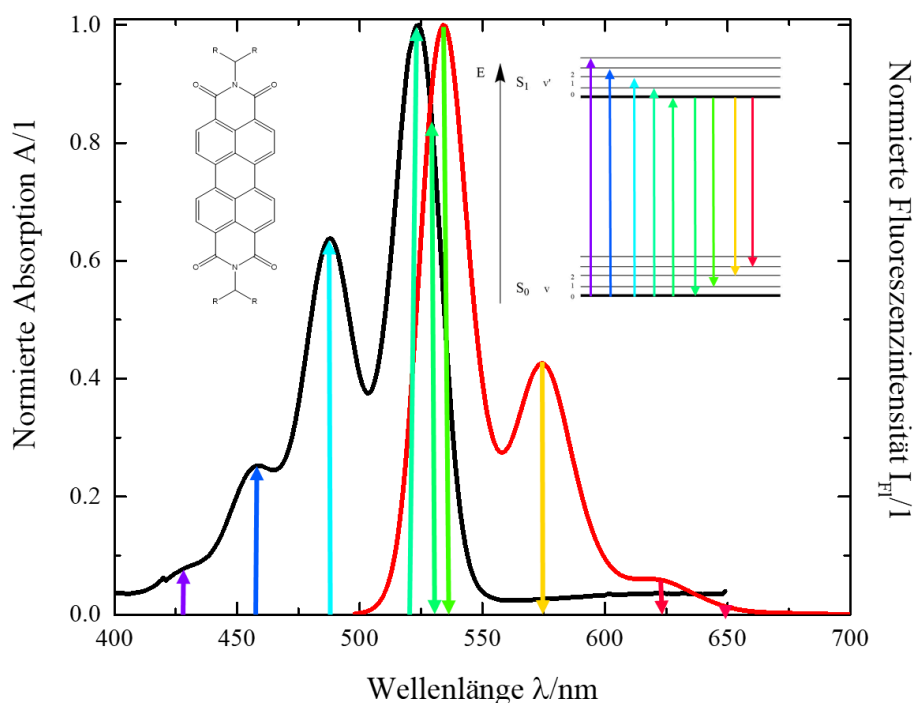
Mit

$$\Phi = \frac{k_{rad}}{k_{rad} + k_{ns}} \quad (2.9)$$

Die Quantenausbeute ist ein Maß für das Verhältnis der Anzahl der absorbierten und emittierten Photonen.

## 2.2.2 Absorptions- und Fluoreszenzspektren

Nachfolgende Abbildung zeigt ein typisches Absorptions- und Emissionsspektrum eines organischen Farbstoffes. Die meisten Farbstoffe zeigen eine sehr breite Absorption über einen recht großen Wellenlängenbereich der oft neben einem Hauptmaximum noch weitere Schultern mit weniger intensiven lokalen Maxima besitzt. Manche hochsymmetrischen Farbstoffe, wie Terrylenfarbstoffe, besitzen eine sehr stark ausgeprägte Substruktur mit vielen Nebenmaxima. Auffällig ist zudem, dass das Emissionsspektrum dem Absorptionsspektrum spiegelbildlich gegenübersteht und um den sogenannten Stokes-Verschiebung *bathochrom* verschoben ist.

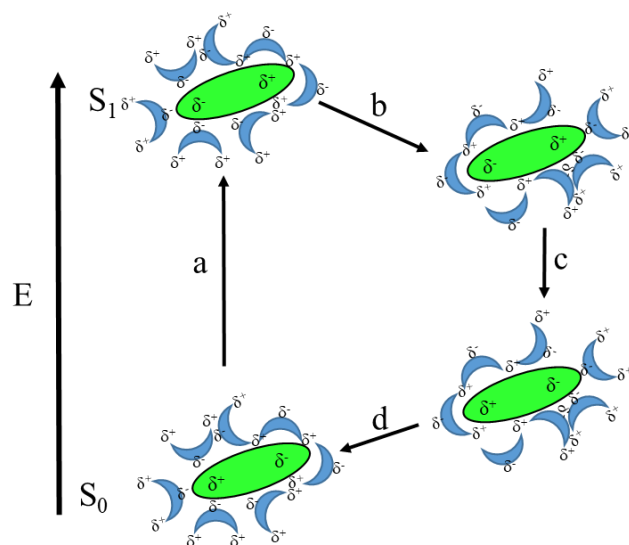


**Abbildung 2-10** Normierte Absorptions- (schwarz) und Emissionsspektren (rot) eines Perrylendiimid-Farbstoffes. Farbig dargestellt sind die verschiedenen vibronischen Übergänge bei der Absorption und Emission. Die Länge der Pfeile im Spektrum ist direkt proportional zur Wahrscheinlichkeit des Übergangs und damit zur Überlappung der Wellenfunktionen der einzelnen vibronischen Zustände.

Die Entstehung der Substruktur sowie die Spiegelsymmetrie der Spektren sind auf das Franck-Condon-Prinzip<sup>[116]</sup> und die daraus abgeleiteten Franck-Condon-Faktoren zurückzuführen.

Die Stokes-Verschiebung, also der Abstand zwischen den Hauptmaxima der Absorption und der Emission, wird auch durch Lösemittleffekte hervorgerufen.<sup>[117,118]</sup> In manchen

Fällen ist die Solvatochromie so stark ausgeprägt, dass der Stokes-Shift mehrere hundert Nanometer betragen kann.<sup>[119]</sup>

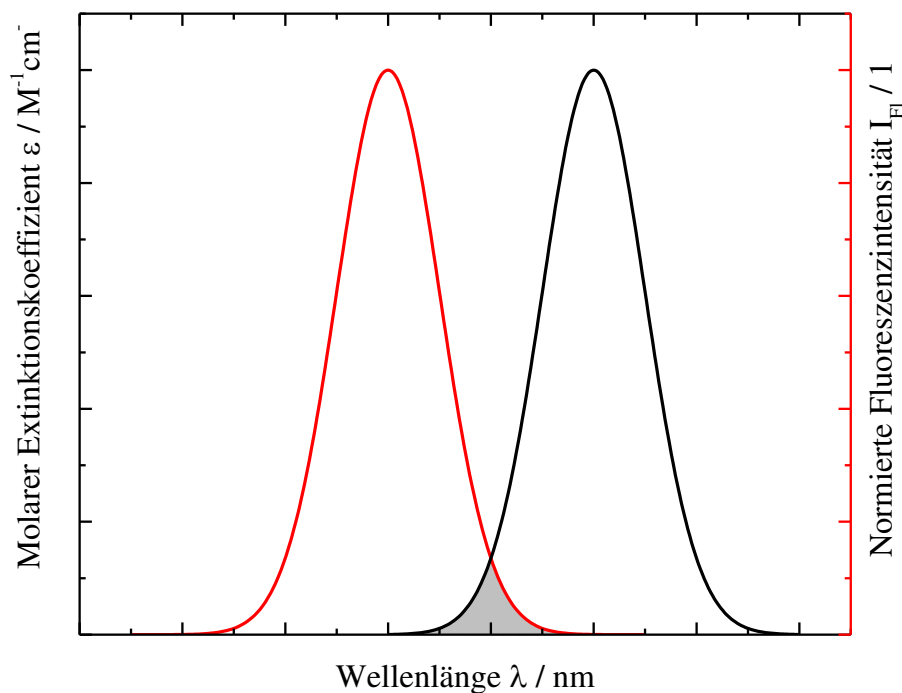


**Abbildung 2-11** Energetische Betrachtung des Lösemiteleinflusses (blau) auf einen Fluorophor (grün). Der Fluorophor absorbiert Photonen (a), durch Reorganisation der LM-Moleküle (b) wird der angeregte Zustand stabilisiert. Nach der strahlenden Rückkehr in den Grundzustand (c) kommt es zu einer weiteren Reorganisation (d) des LM.



### 2.2.3 FRET

Wie bereits in Kapitel 1.2 eingangs erwähnt, handelt es sich bei dem FRET-Prozess um eine strahlungslose Dipol-Dipol-Wechselwirkung eines Donor- und eines geeigneten Akzeptorfarbstoffes. Damit es zu FRET kommen kann, muss das Emissionsspektrum des Donor-Fluorophors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen (s. Abbildung 2-12).



**Abbildung 2-12** Hypothetisches Beispiel eines Emissionsspektrums (rot), welches mit einem Absorptionsspektrum (schwarz) überlappt (grau). Mit Hilfe von Gleichung (2.10) kann daraus das Überlappungsintegral  $J(\lambda)$  berechnet werden.

Es ist ersichtlich, dass das Überlappungsintegral  $J(\lambda)$  umso größer ist, je größer der spektrale Überlapp, je größer der Extinktionskoeffizient des Akzeptors und je höher die Quantenausbeute des Donors ist. Gleichung (2.10) beschreibt die Berechnung des Überlappungsintegrals.<sup>[120]</sup>

$$J(\lambda) = \int F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.10)$$

Das Überlappungsintegral kann auf klassischem Wege aus den Gleichungen der Elektrodynamik oder aus quantenmechanischen Überlegungen berechnet werden. Auffällig ist

jedoch die  $\lambda^4$ -Abhängigkeit, was bedeutet, dass sich Farbstoffe mit längerwelliger Emission bzw. Absorption ein stärkeres Überlappungsintegral besitzen.

Die Rate mit welcher der FRET stattfinden kann, ist unter anderem abhängig vom räumlichen Abstand  $r$  des Donor-Akzeptor-Paars und der Orientierung  $\kappa$  der am Prozess beteiligten Übergangsdipolmomente.

$$k_{FRET}(r) = \frac{\phi_D \kappa^2 9000 \ln(10)}{\tau_D r^6 128 \pi^5 N_A n^4} J(\lambda) \quad (2.11)$$

Weiter ist die Rate des Energietransfers abhängig vom Brechungsindex  $n$  des Lösemittels bzw. der Umgebung, sowie der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_D$  und der Quantenausbeute  $\phi_D$  des Donors. Normalerweise wird für frei bewegliche Moleküle in Lösung ein Wert von  $\kappa^2 = 2/3$  für den Orientierungsfaktor angenommen. Dieser ergibt sich aus der statistischen Verteilung der Orientierung der Übergangsdipolmomente zueinander.<sup>[120]</sup>

Zur Vereinfachung wurde der sogenannte Förster-Radius  $R_0$  eingeführt.

$$R_0 = \sqrt[6]{\frac{\phi_D \kappa^2 9000 \ln(10)}{\tau_D r^6 128 \pi^5 N_A n^4} J(\lambda)} \quad (2.12)$$

Eingesetzt in Gleichung (2.11) ergibt sich

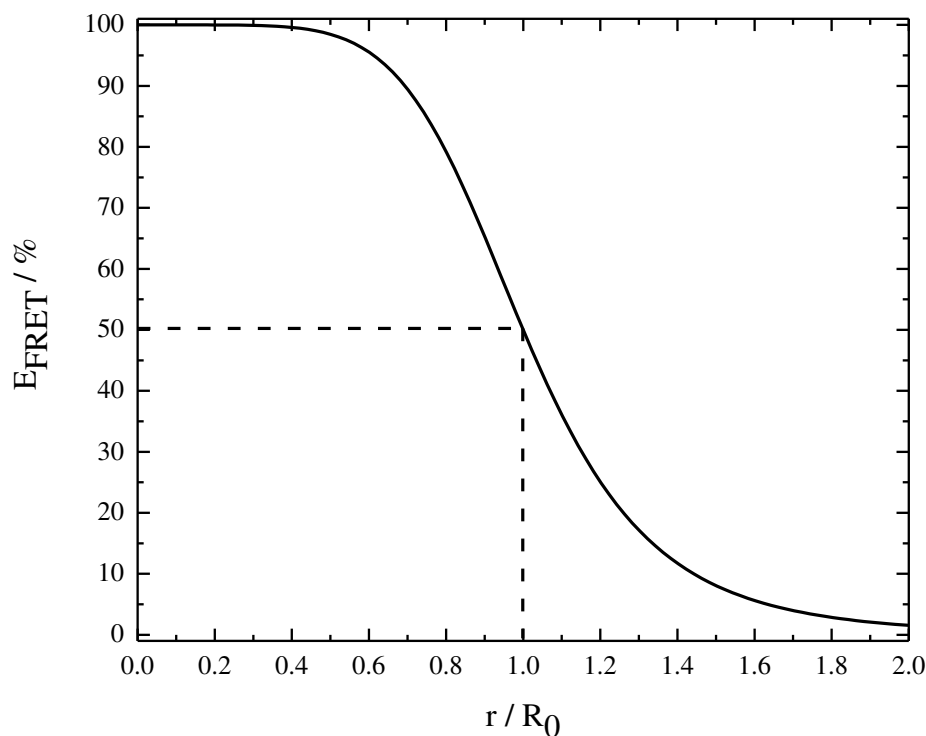
$$k_{FRET}(r) = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (2.13)$$

was bedeutet, dass der Förster-Radius genau dem Donor-Akzeptor-Abstand entspricht, an dem die Transferrate 50% beträgt.

Aus diesen Gleichungen lässt sich die FRET-Effizienz auf verschiedene Weise berechnen und experimentell bestimmen.

$$E_{FRET} = \frac{k_{FRET}(r)}{\tau_{rad,D}^{-1} + k_{FRET}(r)} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} = 1 - \frac{I_{Fl,DA}}{I_{Fl,D}} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (2.14)$$

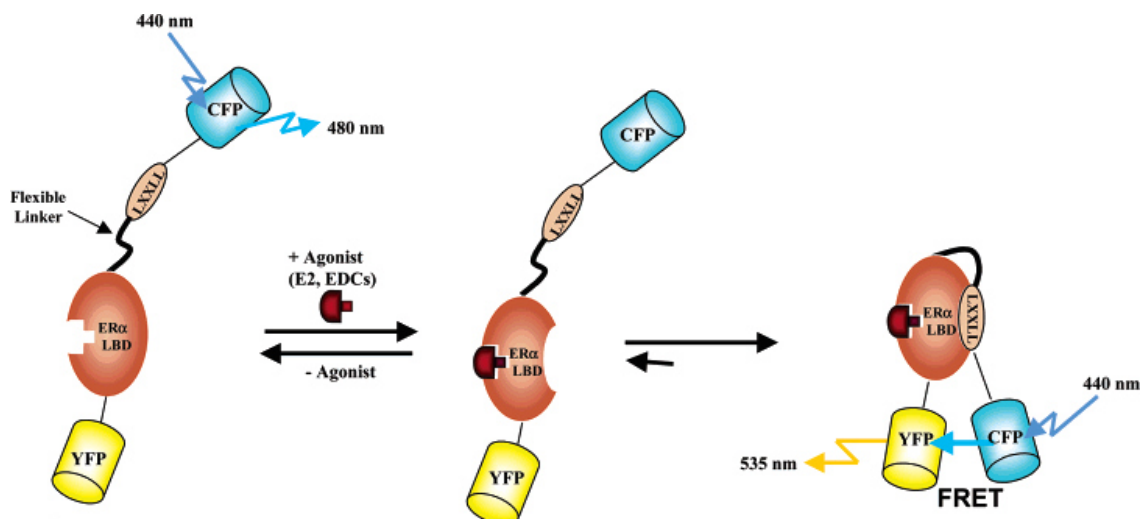
Hier bezeichnet  $I_{Fl,DA}$  bzw.  $\tau_{DA}$  das Emissionsspektrum bzw. die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Gegenwart des Akzeptors. Im Umkehrschluss folgt aus Gleichung (2.14), dass die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Anwesenheit des Akzeptors  $\tau_{DA}$  umso geringer ist je größer die Transfereffizienz  $E_{FRET}$  ist.



**Abbildung 2-13** Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Donor-Akzeptor-Abstand.

FRET wird in den Biowissenschaften gerne als „molekulares Lineal“ benutzt, da sich mit dessen Hilfe leicht die räumlichen Abstände<sup>[121]</sup> zwischen den beteiligten Farbstoffmolekülen bestimmen lassen. Dadurch können beispielsweise Vorgänge bei der Proteinfaltung<sup>[122]</sup> und Protein-Protein-Interaktionen<sup>[123]</sup>, oder allgemeiner, der Interaktion zweier mit FRET kompatiblen Farbstoffen markierte Biomoleküle<sup>[124,125]</sup>, studiert werden. Die Studien können sowohl *in-situ*<sup>[124,126]</sup>, *in-vitro*<sup>[125,127]</sup> sowie *in-vivo*<sup>[127–129]</sup> erfolgen und können auch mikroskopisch verfolgt werden.

Der FRET kann auch dazu verwendet werden, molekulare Sensoren zu konstruieren. Solche Sensoren basieren auf verschiedenen Prinzipien. Beispielsweise kann die Präsenz eines Analyten dazu führen, dass sich die Konformation eines großen Biomoleküls ändert und somit Donor und Akzeptor-Farbstoff in räumliche Nähe zueinander bringt. Nach dieser Methode konnte beispielsweise ein Indikator für Östrogene in Zellen entwickelt werden.<sup>[130]</sup>



**Abbildung 2-14** Beispiel für einen genetisch codierten FRET Indikator für die Detektion von Östrogenen.<sup>[130]</sup>

An den beiden Enden des Indikators befindet sich ein FRET kompatibles Paar aus fluoreszenten Proteinen. Bindet nun das Target Östrogen 17- $\beta$ E an die Bindungsdomäne des Östrogen-Rezeptors, kommt es zur Konformationsänderung des Proteins, so dass der am CFP angebrachte Teil des Tandem-Fusions-Proteins an den Rezeptor binden kann. Dadurch wird das CFP in räumliche Nähe zum YFP gebracht und kann über FRET seine Energie an dieses übertragen. Solche Konformationsänderungen müssen nicht nur auf der Interaktion von Komplexen Ligand-Rezeptor-System wie im obigen Fall beruhen, sondern können auch durch kleine einfache Analyten wie Calcium induziert werden.<sup>[131,132]</sup>

Eine andere Methode zur Konstruktion eines Sensors basiert darauf, sowohl den Sensor als auch den Analyten mit FRET-Kompatiblen Farbstoffen zu markieren. Sobald diese miteinander interagieren, kommt es zum Energietransfer und einer damit verbundenen, detektierbaren Änderung der Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe.<sup>[133]</sup>

Eine weitere Methode, die auch in dieser Arbeit bei der Konstruktion des vorgeschlagenen Sensor verwendet wurde, beruht darauf, dass der Energieübertrag eines markierten

Sensors direkt auf den Analyten übertragen wird. Hierzu ist es aber notwendig, dass der Analyt inhärent ein passendes Absorptionsspektrum besitzt. Für diesen Fall gibt es bisher nur wenige Beispiele in der Literatur.<sup>[37,38,43,99,134]</sup> Häufiger ist der umgekehrte Fall, indem die Autofluoreszenz von Biomolekülen, verursacht durch Tyrosin- und Tryptophan-Reste, dazu verwendet wird, ihre Energie auf einen mit einem Akzeptor gelabelten Analyten zu übertragen.<sup>[135–138]</sup>

### 2.2.3.1 Kupfer(II)-Komplexe als FRET-Akzeptoren

Wie zuvor in Abschnitt 2.1.4 gezeigt existiert eine Vielzahl von Sensoren die auf FRET mit einem  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex als Akzeptor basieren. Die Fähigkeit von Kupfer, sichtbares Licht im grün-roten Teil des elektromagnetischen Spektrums zu absorbieren, rührt von der durch die Liganden induzierten Aufspaltung der d-Orbitale des Metalls her.<sup>[139]</sup> In der spektrochemischen Reihe werden sowohl den Stickstoffliganden<sup>[140,141]</sup> als auch dem Zentralmetall Kupfer(II)<sup>[142]</sup> eine hohe Ligandenfeldaufspaltung zugeschrieben. Dies resultiert in einem *hypsochrom* verschobenen Absorptionsspektrum, sowie einer Vergrößerung des Extinktionskoeffizienten. Der Effekt der Ligandenfeldaufspaltung durch Peptide und auf das daraus resultierende Absorptionsspektrum lässt sich gut mit einem von Prenesti *et al.* entwickelten Inkrementsystem vorhersagen.<sup>[143]</sup> In dieser Arbeit haben die Autoren die Absorptionsspektren von mehr als 100 Kupfer(II)-Peptid-Komplexen einer rigorosen statistischen Analyse unterzogen. Daraus konnten sie empirische Werte für die in Peptidkomplexen vorkommenden Liganden extrahieren (s. Abbildung 2-15).

Donor group		$\bar{\nu}_i$
		This work
Amino nitrogen	an	$0.450^a \pm 0.006^b$
Peptide nitrogen	pn	$0.495 \pm 0.008$
Imidazole nitrogen	in	$0.427 \pm 0.009$
Carboxylate oxygen	co	$0.353 \pm 0.008$
Alcoholate oxygen	ao	$0.39 \pm 0.01$
Hydroxide oxygen	ho	$0.39 \pm 0.03$
Water oxygen	wo	$0.296 \pm 0.006$

<sup>a</sup>  $\mu\text{m}^{-1}$ .

**Abbildung 2-15** Die von Prenesti *et al.* ermittelten Koeffizienten zur Abschätzung des Absorptionsmaximums eines Peptidkomplexes.

Zur Berechnung müssen die für den betrachteten Komplex zutreffenden Werte in Gleichung (2.15) eingesetzt werden.

$$\lambda_{max} = \frac{1000}{\sum_{i=1}^4 i \tilde{\nu}} \text{ nm} \quad (2.15)$$

Mit Hilfe dieses Inkrementsystems lässt sich das Absorptionsmaximum von Kupfer(II)-Peptid-Komplexen mit einem Fehler von  $\Delta\lambda = \pm 10 \text{ nm}$  abschätzen.

## 2.3 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen – TCSPC

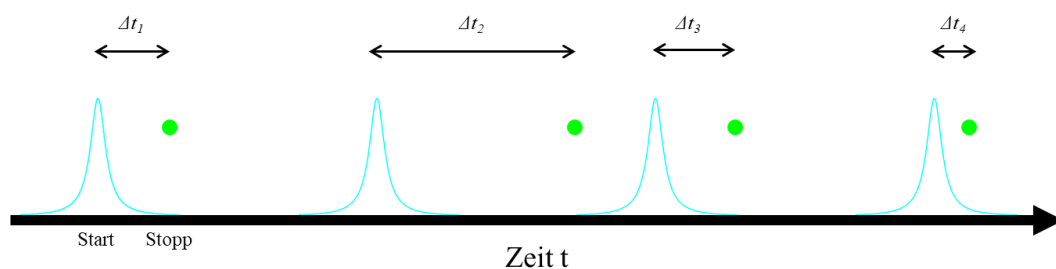
Grundsätzlich existieren zwei verschiedene komplementäre experimentelle Techniken, mit denen sich die Relaxationsdauer eines angeregten strahlenden Zustandes messen lässt. Die Fluoreszenzlebensdauer lässt sich über Messungen in der sog. Frequenzdomäne oder über Messungen in der sog. Zeitdomäne bestimmen. Die Messprinzipien der erstgenannten Methode sollen hier nur kurz angezeichnet werden und stattdessen auf weiterführende Literatur<sup>[120,144–148]</sup> verwiesen werden.

Bei Messungen in der Frequenzdomäne wird als Anregungsquelle eine intensitätsmodulierte kontinuierliche Lichtquelle verwendet. Dieses Anregungslicht populierte den  $S_1$ -Zustand des in der Probe befindlichen Fluorophors, welcher darauffolgend mit einer charakteristischen Fluoreszenzlebensdauer *bathochrom* verschobenes Licht emittiert. Diese elektromagnetische Strahlung besitzt im Vergleich zum Anregungslicht eine geringere Amplitude und ist um den Phasenwinkel  $\varphi$  zum Anregungslicht verschoben.<sup>[120]</sup> Durch Bildung des Quotienten der Modulationen und Phasenwinkel sowie Messung dieser bei verschiedenen Modulationsfrequenzen des Anregungslichts lässt sich die Fluoreszenzlebensdauer eines Fluorophors bestimmen.

Messungen in der Zeitdomäne werden durch das sog. Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählen TCSPC (engl. *Time correlated single photon counting*) realisiert. Diese Methode soll in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden.

### 2.3.1 Messprinzip

Das TCSPC-Experiment gleicht in seinen Grundzügen einem einfachen Start-Stopp-Experiment. Der (idealerweise) zeitlich unendlich schmale  $\delta$ -Puls (Start-Signal) einer Laserquelle regt die zu untersuchenden Fluorophore an, welche daraufhin mit einer Zeitverzögerung  $\Delta t$  in Bezug auf den Anregungspuls Photonen emittieren. Diese Photonen treffen auf einen für die Einzelphotonendetektion ausgelegten Detektor und lösen dadurch das Stopp-Signal der Messung aus. (s. Abbildung 2-16)



**Abbildung 2-16** Messprinzip des modernen TCSPC. Der Laserpuls (türkis) bildet das Start-Signal der Zeitmessung. Sobald das emittierte Photon (grün) am Detektor auftritt, wird die Zeitmessung gestoppt. Das Zeitintervall  $\Delta t$  wird anschließend in einem Histogramm gespeichert. Die experimentellen Einstellungen werden so gewählt, dass pro Signalperiode maximal ein Photon registriert wird.

Die Messung wird  $n$ -mal wiederholt und jedes gemessene Zeitintervall  $\Delta t$  in ein Histogramm eingetragen. Das Histogramm ist unterteilt in sog. Timebins oder Zeitkanäle  $i$ , welche in der Regel eine zeitliche Breite von 4 ps bis mehrere ns haben können. Die Einhüllende des so erhaltenen Histogramms lässt sich durch eine Exponentialfunktion beschreiben, die dem Depopulationsverhalten des  $S_1$ -Zustandes entspricht.<sup>[149]</sup>

Allgemein lässt sich die Fluoreszenz als Reaktion erster Ordnung auffassen, dessen Lösung eine abfallende Exponentialfunktion darstellt und die Fluoreszenzlebensdauer enthält.<sup>1</sup>

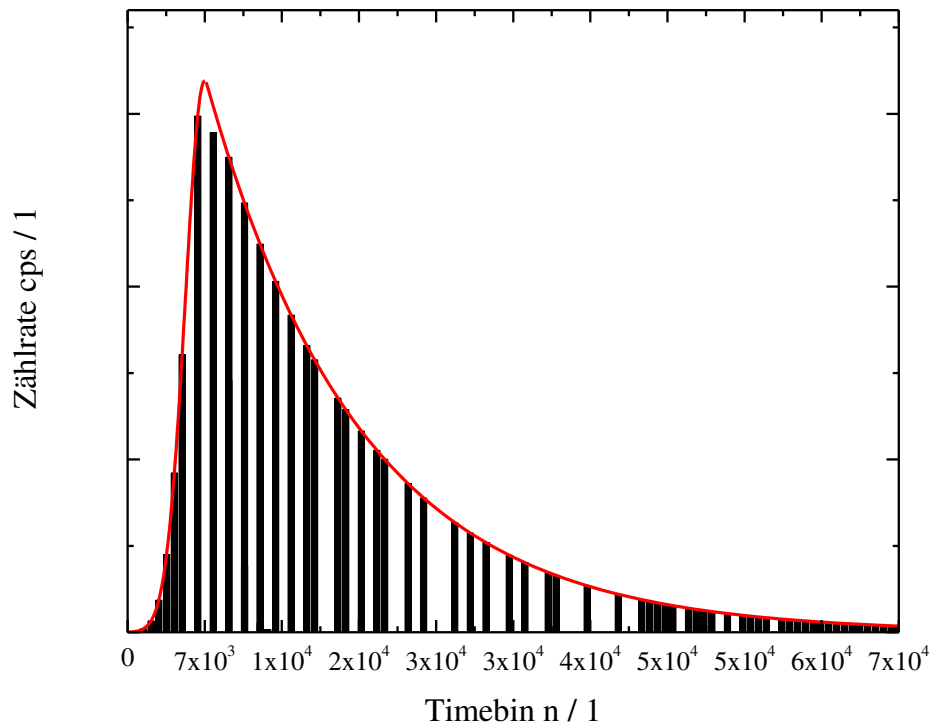
$$I_{Dec}(t) = I_0 \sum_i A_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_{FL,i}}\right) \quad (2.16)$$

Neben mono- und multiexponentiellen Zerfällen kann es auch unter bestimmten Umständen zu nichtexponentiellen Verhalten kommen, wenn beispielsweise weitere Reaktionen

<sup>1</sup>  $I_0$  steht hier für die Intensität des aufgezeichneten Zerfalls zum Zeitpunkt  $t = 0$ . Die Amplituden  $A_i$  stehen für den Anteil den eine Spezies  $i$  an dem Gesamtzerfall hat. Für die Amplituden gilt  $\sum_i A_i = 1$ .

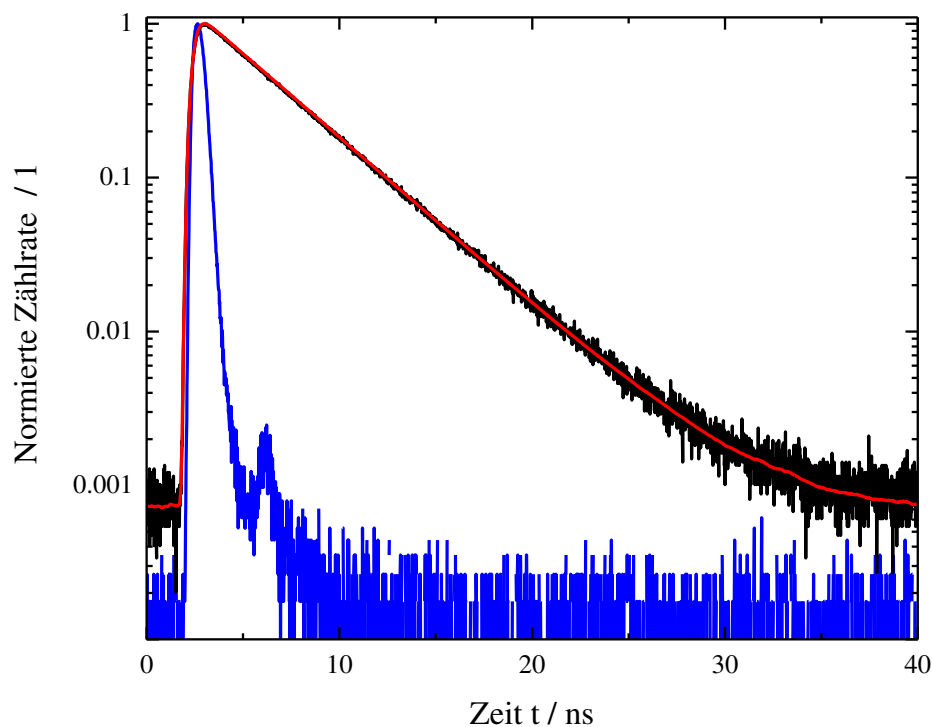


neben der Fluoreszenz an der Depopulierung des  $S_1$ -Zustandes beteiligt sind.<sup>[150–154]</sup> Hier ist eine genaue Betrachtung und mathematische Behandlung der involvierten Relaxationskinetiken zur Entwicklung eines geeigneten Anpassungsmodells von Nöten.



**Abbildung 2-17** Die am Detektor auftreffenden Photonen werden als diskrete Werte in die entsprechenden Zeitkanäle gemäß ihrer Ankunftszeiten eingetragen. Daraus ergibt sich ein diskretes Histogramm (schwarze Balken, nicht alle Kanäle gezeigt) dessen Einhüllende der Faltung aus Anregungspuls und exponentiellem Zerfall des angeregten  $S_1$ -Zustandes entspricht.

Nachfolgenden Abbildung zeigt eine experimentell bestimmte Zerfallskurve des ersten angeregten Zustandes einer Rhodamin 110 Lösung in einem PBS-Puffer mit  $pH = 7$ .



**Abbildung 2-18** Experimenteller Fluoreszenzzerfall (schwarz), monoexponentieller Rekonvolutionsfit (rot) und ermittelte IRF (blau) einer 10 nM Rhodamin 110 Lösung (PBS  $pH = 7$ ). Gemessen bei  $\lambda_{ex} = 470$  nm,  $\lambda_{em} = 525 \pm 50$  nm, Repetitionsrate 20 MHz und einer durchschnittlichen Laserleistung von 20  $\mu$ W. Die berechnete Fluoreszenzlebensdauer beträgt  $\tau_{Fl} = 3.97 \pm 0.03$  ns ( $\chi^2 = 1.061$ )

Durch die halblogarithmische Auftragung lässt sich schnell und einfach das monoexponentielle Verhalten der Fluoreszenz erkennen und auswerten.

Grundsätzlich gibt es zwei mögliche Ansätze, die Fluoreszenzzerfälle auszuwerten. Zum einen handelt es sich dabei um das Verfahren des Tailfits, zum andern um einen sog. Rekonvolutionsfit.<sup>[155]</sup> Das erstgenannte Anpassungsverfahren betrachtet nur den hinteren Teil der Zerfallskurve, Tail genannt. Dieser wird mit Hilfe der gängigen Anpassungsalgorithmen an Gleichung (2.16) angepasst.

Das zweite Verfahren, der Rekonvolutionsfit, ist mathematisch komplexer aber auch genauer. Hier werden alle experimentell gewonnenen Photonendaten zur Anpassung herangezogen und nicht, wie im Falle des Tailfits, Information bei kurzen Messzeiten vernachlässigt. Das führt dazu, dass auch Prozesse mit sehr geringen Lebenszeiten im ps-Bereich untersucht werden können.

Beim Rekonvolutionsfit (s. Abbildung 2-18 rote Kurve) wird davon ausgegangen, dass

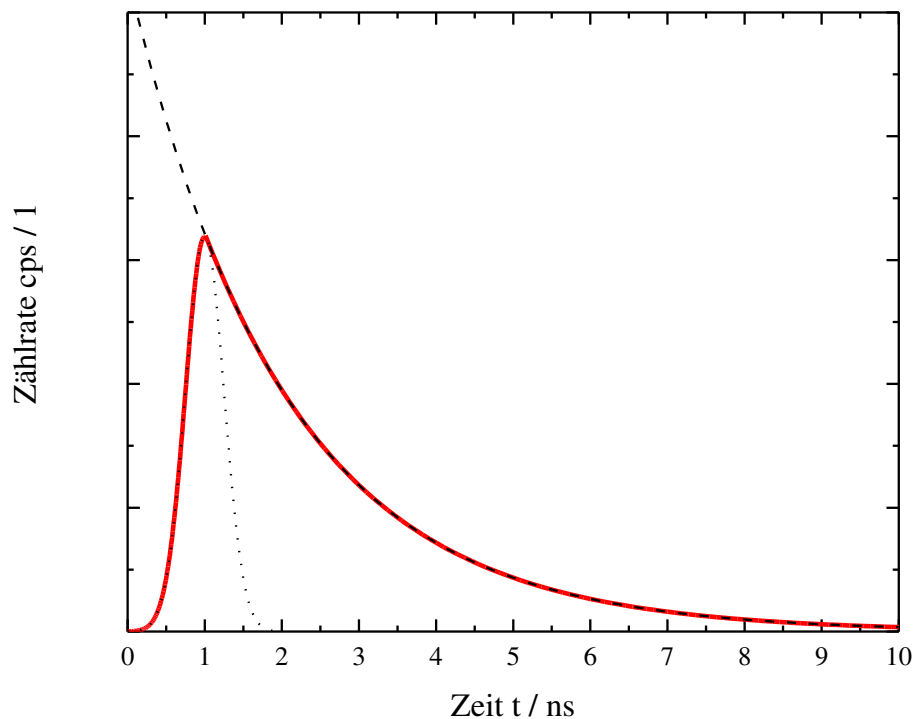
es sich bei der experimentell erhaltenen Funktion  $S(t)$  um eine Faltung der (multi)exponentiellen Fluoreszenzkinetik  $I_{Dec}(t)$  mit der sogenannten Instrumente Antwortfunktion  $IRF(t)$  (eng. *Instrument response function*) handelt. Die genaue Natur und Messung der IRF wird im nächsten Abschnitt erörtert.

$$S(t) = IRF(t) * I_{Dec}(t) = \int_0^{\infty} IRF(t') I_{Dec}(t - t') \quad (2.17)$$

Um die Anpassung an Gleichung (2.17) durchzuführen, wird die Kenntnis von  $IRF(t)$  vorausgesetzt. Diese kann, wie in Kapitel 2.3.2 gezeigt, experimentell bestimmt werden. Passende Anpassungsalgorithmen falten nun die gemessene  $IRF(t)$  mit einem Modell für einen (multi)exponentiellen Zerfall  $I_{Dec}(t)$  und passen die Parameter für Amplitude und Fluoreszenzlebensdauer solange an bis die entsprechenden Bedingungen des Algorithmus erreicht sind (Meist eine Minimierung von  $\chi^2$ ).<sup>[155]</sup>

### 2.3.2 Instrumente Antwortfunktion – IRF

Wie in Abschnitt 2.3.1 schon erwähnt ist die experimentell gemessene Zerfallsfunktion  $S(t)$  eine Faltung mit der IRF. Die IRF entsteht dadurch, dass keine unendlich schmalen  $\delta$ -Anregungspulse existieren und auch die Elektronik eine zeitlich begrenzte Auflösung besitzt. In der Regel beträgt die Pulsbreite der in dem Standard TCPSC-Experiment verwendeten Diodenlaser ca. 100 ps; je nach verwendetem Detektor können die Antwortfunktionen der Detektoren zwischen 40 und 600 ps liegen.<sup>[156–158]</sup>



**Abbildung 2-19** Darstellung der experimentell gemessenen Zerfallsfunktion  $S(t)$  (rot). Diese ergibt sich aus der Faltung der  $IRF(t)$  (gaußähnlicher Puls, schwarze Punkte) mit dem theoretischen exponentiellen Zerfall  $I(t)$  (schwarz gestrichelt) des ersten elektronisch angeregten Singulettzustandes.

Um exakte und valide Messergebnisse zu erhalten, ist die genaue Messung der IRF von großer Bedeutung. Es haben sich verschiedene Methoden etabliert, wie die IRF eines Systems gemessen werden kann. Die einfachste Möglichkeit zur Messung der IRF ist es, ein streuendes Medium in den Strahlengang anstelle der Probe zu bringen. Hierbei handelt es sich meist um eine wässrige verdünnte Dispersion aus mikroskopischen Latexkügelchen. Diese streut das eintreffende Laserlicht auf den Detektor. Das so erhaltene Histogramm spiegelt das zeitliche Verhalten von Laser und Detektor bei der verwendeten Anregungswellenlänge und Repetitionsrate wieder.<sup>[158]</sup>

Das zeitliche Verhalten einiger Detektortypen (v.a. SPADs) hängt jedoch stark von der Wellenlänge des detektierten Lichts ab.<sup>[158]</sup> Da das Fluoreszenzlicht dem Anregungslicht gegenüber rot verschoben ist, kann die Verwendung einer nach der obigen Methode bestimmten IRF zu Fehlern in der Datenauswertung führen. Hier muss also eine Methode gefunden werden, die IRF bei der Detektionswellenlänge zu messen. Im grünen bis orangefarbenen Spektralbereich kann eine Erythrosin B<sup>[157]</sup> Lösung verwendet werden. Dieser Lösung sind 5 M KI zugesetzt. Das Iodid-Anion löscht die Fluoreszenz des Erythrosin B und verkürzt so dessen Lebensdauer auf ca. 25 ps. Da diese Fluoreszenzlebensdauer viel kleiner ist als die Breite der IRF, lässt sich dadurch das korrekte zeitliche Verhalten bei der betrachteten Wellenlänge messen. In den letzten Jahren entstanden so mehrere ähnliche Methoden, um das exakte zeitliche Verhalten der IRF zu bestimmen.<sup>[158–162]</sup>

Bei der Bestimmung der IRF muss zudem darauf geachtet werden, dass die gemessenen IRF nur bei der verwendeten Laserleistung gültig ist: Wird die Laserleistung verändert, so verändert sich auch die Form und das zeitliche Verhalten der IRF. Von diesem Phänomen sind vor allem Diodenlaser betroffen. Daher muss nach jeder Änderung der Leistung die IRF neu bestimmt werden. Zudem sollte die IRF auch bei der gleichen differentiellen Zählrate wie die eigentliche Messung der Fluoreszenzlebensdauer bestimmt werden. Diese errechnet sich wie folgt:

$$\text{Diff. Zählrate} = \frac{\text{Durchschnittliche Zählrate}}{\text{Repetitionsfrequenz} * \text{Pulsbreite}} \quad (2.18)$$

Die differentielle Zählrate ist also die momentane Zählrate am Detektor in einer Signalperiode. Das bedeutet, dass eine Lebensdauerermessung bei einer Laserrepetitionsrate von 20 MHz, einer Lebensdauer von 5 ns („Pulsbreite“ des Fluorophors) und einer durchschnittlichen Zählrate von 50 kcps in einer differentiellen Zählrate von 500 kcps resultiert. Eine 250 ps breite IRF gemessen bei den gleichen Bedingungen würde eine differentielle Zählrate von 10.000 kcps ergeben. Gerade bei Detektoren, deren zeitliches Verhalten stark von der Zählrate abhängt, muss diesem Umstand Rechnung getragen werden und die differentiellen Zählraten verwendet werden.<sup>[163]</sup>

### 2.3.3 Fluoreszenzlebensdauermikroskopie – FLIM

Durch die Kombination von Lebenszeitmessungen und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wird die sogenannte Fluoreszenzlebensdauermikroskopie – FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) – geschaffen.<sup>[164]</sup> Mit Hilfe dieser Technik können mikroskopische Bilder von (biologischen) Proben aufgenommen werden. Diese beinhalten neben den Fluoreszenzintensitäten nun auch Informationen über Fluoreszenzzerfälle. Aus jedem Pixel kann eine eigene Zerfallsfunktion erhalten und analysiert werden. Dadurch wird ein Bild erhalten, das die unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern der Probe darstellt. Prinzipiell kann mit der FLIM jeder Prozess sichtbar gemacht und untersucht werden, der die Fluoreszenzlebensdauer des untersuchten Fluorophors verändert. Mittlerweile existieren, vor allem in den *life sciences*, eine Vielzahl von fluoreszenten Sonden und Sensoren, welche auf verschiedenste Parameter reagieren. Bei diesen Parametern kann es sich um Viskositäten<sup>[165]</sup>, Temperaturen<sup>[166]</sup>, pH-Werten<sup>[10]</sup>, Brechungsindizes<sup>[167,168]</sup>, biologische Prozesse<sup>[169]</sup> oder Konzentrationen bestimmter Analyte<sup>[170]</sup> handeln.

### 2.3.4 Artefakte

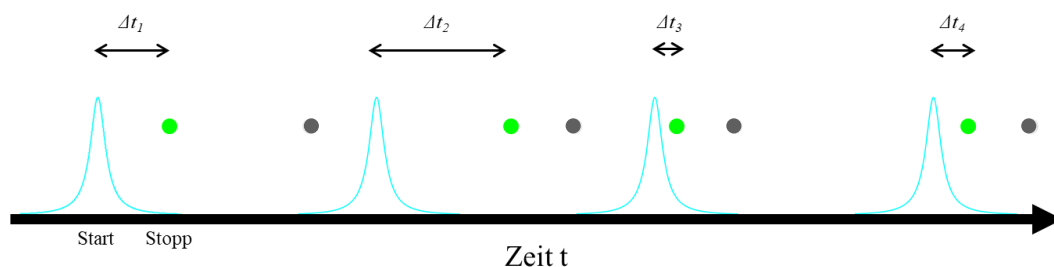
Bei TCSPC-Messungen können Artefakte auftreten. Als Artefakte werden Störungen oder Verzerrungen des Messsignals bezeichnet, die sich meist aus falschen experimentellen Bedingungen und Einstellung ergeben. Die wichtigsten dieser Artefakte sowie Strategien zur Vermeidung dieser sollen im Nachfolgenden erläutert werden.

#### 2.3.4.1 Pile-Up

Pile-Up Effekte entstehen durch die Tatsache, dass die für die TCSPC verwendeten Detektoren nur ein Photon pro Signalperiode aufzeichnen können. Bei zu hohen Photonenflüssen und damit einhergehenden zu hohen Zählraten am Detektor kommt es zu einer Verschiebung des Messsignals hin zu kleineren Abklingzeiten  $\tau$ .<sup>[171,172]</sup>

Die in der TCSPC verwendeten SPAD Detektoren besitzen typischerweise Totzeiten zwischen 50 und 90 ns.<sup>[173]</sup> Wird nun während einer Signalperiode mehr als ein Photon erzeugt, kann aufgrund der Totzeit des Detektors nur das erste Photon detektiert und im entsprechenden Zeitkanal des Histogramms registriert werden. Nachfolgende Photonen

mit einem größeren  $\Delta t$  besitzen somit eine weitaus geringere Wahrscheinlichkeit detektiert zu werden. Das führt dazu, dass Photonen im hinteren Teil des Fluoreszenzzerfalls nicht mehr detektiert werden. Somit verschiebt sich die berechnete Zerfallszeit  $\tau$  hin zu kleineren Werten. Dieser Effekt kann leicht experimentell beseitigt werden, indem die experimentellen Bedingungen so gewählt werden, dass die Detektorzählrate ca. 0.1-1% der Repetitionsfrequenz des Lasers entspricht. Anschaulich bedeutet das, dass in einem Experiment mit einem bei 20 MHz gepulsten Laser die Zählrate am Detektor keine 200 kcps übersteigen sollte. Eine Zählrate von 200 kcps bei einer Repetitionsrate von 20 MHz bedeutet, dass nur etwa jeder hundertste Laserpuls zu einem Detektionsereignis am Detektor führt.



**Abbildung 2-20** Zustandekommen des klassischen Pile-Up-Effekts. Treffen pro Signalperiode mehr als ein Photon auf den Detektor wird nur das zeitlich zuerst auftreffende Photon (grün) registriert. Nachfolgende Photonen (grau) werden nicht mehr registriert. Dies führt zu einer Bevorzugung früher Photonen und damit zu einer Verschiebung zu kürzeren Abklingzeiten.

Es existiert noch eine weitere Variante des „Pile-Ups“, der Inter-Puls-Pile-Up.<sup>[149,174]</sup> Dieser unterscheidet sich sowohl in seinem Ursprung als auch in seiner Auswirkung auf die aufgezeichnete Zerfallskurve. Im Gegensatz zum klassischen Pile-Up wird die Abklingkurve nicht zu kürzeren Zeiten verschoben, sondern es kommt zu zusätzlichen „Stufen“ im Histogramm. Dieser Effekt tritt vor allem bei Experimenten mit hohen Repetitionsraten auf und macht sich allerdings nur bemerkbar in älteren TCSPC-Elektroniken, in denen das Start- und Stopp-Signal vertauscht ist.

### 2.3.4.2 Reabsorption

Reabsorptionseffekte treten auf bei hohen optischen Dichten der zu untersuchenden Probenlösung oder falschen Anregungs- und Detektionsgeometrien und werden vor allem bei Fluorophoren mit einer kleinen Stokes-Verschiebung, also einer großen Überlappung

von Absorptions- und Fluoreszenzspektrum beobachtet. Diese Effekte können zu scheinbar längeren Abklingzeiten und multiexponentiellen Zerfällen führen. Der Grund ist, dass ein von einem Fluorophor emittiertes Photon von einem anderem Fluorophor reabsorbiert werden kann. Dieser Fluorophor emittiert wiederum selbst und verlängert so das eigentliche Zeitintervall  $\Delta t$ .<sup>[149]</sup>

### 2.3.4.3 Fluoreszenzdepolarisation

Der Anregungslaser regt vor allem solche Fluorophore an, deren Dipolmoment parallel zur Polarisationsrichtung des Lasers orientiert sind. Aufgrund dessen sind die emittierten Fluoreszenzphotonen teilweise polarisiert. Durch Rotationsbewegungen der Fluorophore depolarisiert das Fluoreszenzlicht mit einem für den jeweiligen Fluorophor signifikanten Zerfallszeit. Diese kann bei kleinen Molekülen im Bereich von 0.1 ns liegen, sich bei großen Fluorophoren wie beispielsweise Fluoreszenzproteinen bis auf 100 ns ausdehnen. Dieser zusätzliche detektierte Zerfall führt zu einem bi- bzw. multiexponentiellen Zerfall des  $S_1$ -Zustandes<sup>[175]</sup> und kann bei Nichtberücksichtigung zu falschen Ergebnissen führen. Um Depolarisationseffekte auszuschalten, kann das Fluoreszenzlicht unter dem sogenannten Magic-Angle gemessen werden. Dazu wird ein Polarisationsfilter vor den Detektor gebracht und ein Winkel von  $54.7^\circ$ , bezogen auf den Polarisationswinkel des Anregungslasers, eingestellt. Auf eine genaue Behandlung der Fluoreszenzdepolarisation und des Magic-Angles soll hier verzichtet werden und nur auf die einschlägige Literatur verwiesen werden.<sup>[149,176,177]</sup>

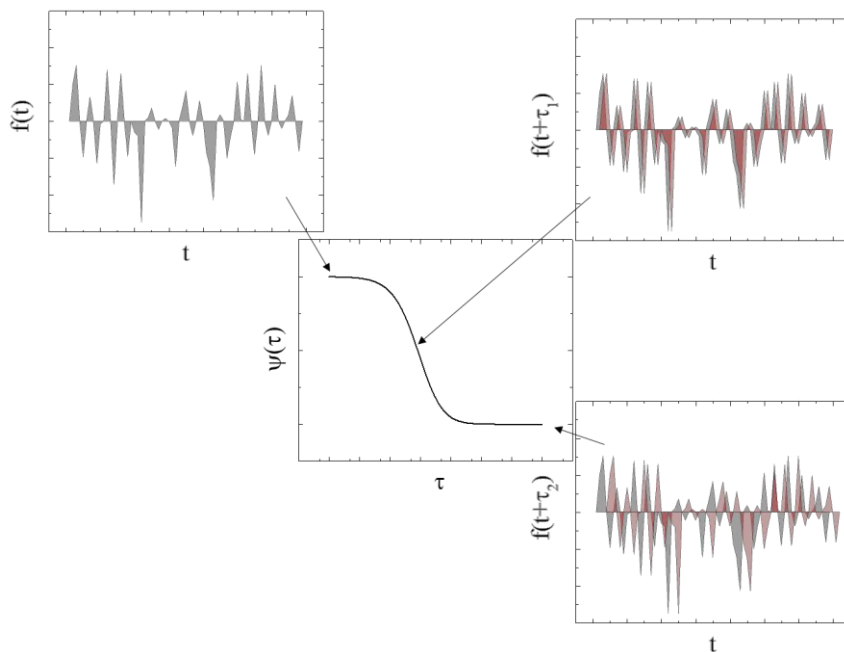


## 2.4 Korrelationsspektroskopie

Allgemein bezeichnet der Begriff Korrelation einen nicht notwendigerweise kausalen Zusammenhang zweier oder mehrerer Messgrößen. Korrelationsanalysen werden heutzutage in einer Vielzahl von Anwendungen eingesetzt. Sie vergleichen Messgrößen, die zeitliche (Signale in der Signalverarbeitung)<sup>[178]</sup> oder örtliche (Bildverarbeitung)<sup>[179,180]</sup> Variationen mit sich selbst (Autokorrelation) oder untereinander (Kreuzkorrelation) aufweisen. Das Ergebnis einer solchen Analyse ist ein Maß für die Ähnlichkeit des Signals mit sich selbst bzw. mit einem zweiten Signal. Zur Durchführung einer Korrelationsanalyse wird die sogenannte Korrelationsfunktion herangezogen. Zur Vereinfachung wird hier nur die Autokorrelationsfunktion eines zeitlichen Signals betrachtet.<sup>[181]</sup>

$$\psi(\tau) = \langle f(t) \cdot f(t + \tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T f(t) f(t + \tau) dt \quad (2.19)$$

Die Autokorrelationsfunktion bildet also den zeitlichen Mittelwert einer Zeitfunktion  $f(t)$  mit der gleichen Zeitfunktion  $f(t + \tau)$  zu einem späteren Zeitpunkt  $\tau$ .



**Abbildung 2-21** Erzeugung der Autokorrelationsfunktion  $\psi(\tau)$  durch Anwendung von Gleichung (2.19) auf eine zeitlich fluktuierende Funktion  $f(t)$  zu den Zeitpunkten  $t$ ,  $t + \tau_1$  und  $t + \tau_2$ .

Abbildung 2-21 verdeutlicht die Entstehung der Autokorrelation. Das grau hinterlegte Signal bezeichnet die Funktion  $f(t)$  zum Zeitpunkt  $\tau = 0$ . Hier nimmt der Wert der Autokorrelationsfunktion  $\psi(\tau)$  ein Maximum an, da die beiden Signale, die verglichen werden, gleich sind. Zu einem späteren Zeitpunkt ist das ursprüngliche Signal um einen Wert  $\tau_1$  verschoben (rot). Hier ähneln sich die beiden Signale nur noch wenig und der Wert der Korrelationsfunktion nimmt ab. Wird die Verzögerungs- oder Korrelationszeit  $\tau$  groß genug gewählt, so besteht zwischen dem jetzigen und dem ursprünglichen Signal keinerlei Ähnlichkeit und die Autokorrelationsfunktion  $\psi(\tau)$  nimmt einen Minimalwert an.

Korrealtionsanalysen sind nicht nur ein mächtiges mathematisches Werkzeug in der Nachrichtentechnik und Bildverarbeitung, sondern werden auch in weiten Feldern der Physik und Naturwissenschaften eingesetzt. So bilden sie die theoretische Grundlage für viele interferometrische Messungen in der Astrophysik<sup>[182]</sup> und Teilchenphysik<sup>[183]</sup> (Hanbury-Brown-Twiss).<sup>[184]</sup> In der dynamischen Lichtstreuung wird das gestreute Licht einer Korrelationsanalyse unterzogen, um die Teilchengrößenverteilungen der Probe zu bestimmen.<sup>[185]</sup>

In verschiedenen Gebieten der Chemie, Biophysik, Biologie und Biophysikalischen Chemie hat sich eine in den 1970er Jahren von Webb, Magde und Elliot<sup>[186–188]</sup> entwickelte Methode etabliert, die sogenannte Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS). Von dieser Methode bzw. einer Variante dieser, wird in der vorliegenden Arbeit Gebrauch gemacht. In den nachfolgenden Abschnitten soll die FCS näher erläutert werden und deren theoretische Grundlagen, Erweiterungen und Anwendungen betrachtet werden.

### 2.4.1 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie – FCS

Die FCS stellt ein leistungsstarkes Werkzeug der modernen spektroskopischen Verfahren im Bereich der *life sciences*, aber auch im Bereich der Physik und physikalischen Chemie dar. Aus einer FCS Messung einer fluoreszierenden Probe können viele physikochemische Parameter gewonnen werden: diese reichen von trivialen Größen wie Konzentrationen und Diffusionskoeffizienten<sup>[189,190]</sup> bis hin zu Ratenkonstanten inter- und intramolekularer Reaktionen bzw. photochemischer Vorgänge.<sup>[12,191–196]</sup>

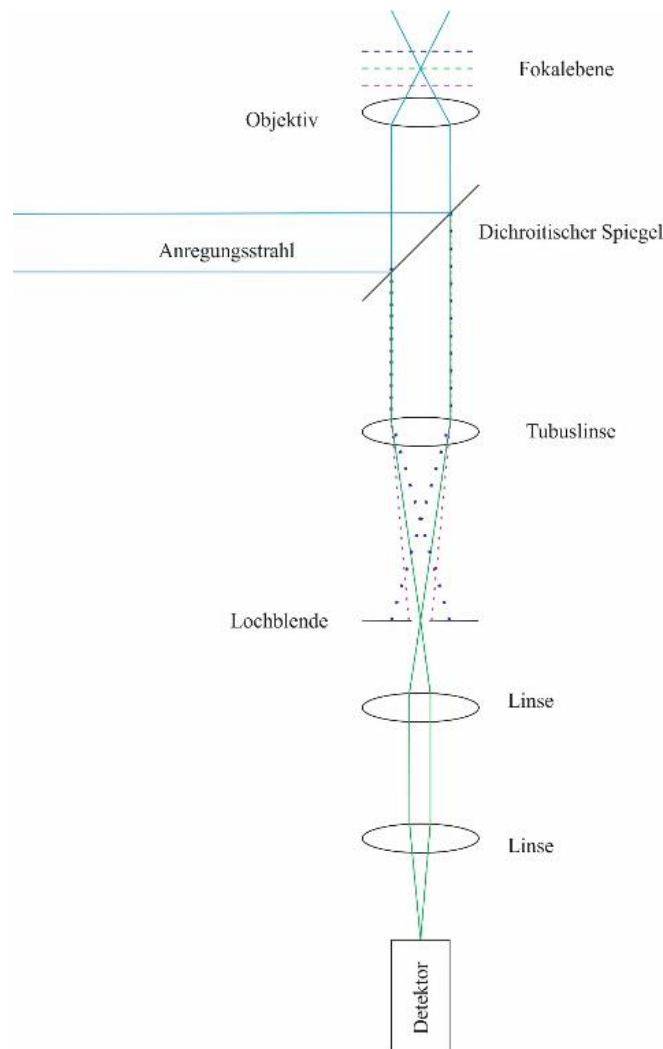
Im Gegensatz zur klassischen Fluoreszenzspektroskopie handelt es sich hierbei nicht um Ensemble-Messungen, sondern um eine Technik der Einzelmolekülspektroskopie. Sie gewinnt ihre Information aus den zeitlichen Fluktuationen des Fluoreszenzsignals einzelner Moleküle.

Prinzipiell lassen sich mit der FCS jedwede Prozesse untersuchen, welche sich in einer Änderung der Intensität des Emissionslichts widerspiegeln. Im simpelsten Fall handelt es sich hierbei um klassische Diffusionsvorgänge, verursacht durch die Brown'sche'-Molekularbewegung.<sup>[49]</sup>

#### 2.4.1.1 Aufbau und experimentelle Durchführungen

Ein typisches FCS-Experiment ist eher simpel aufgebaut<sup>[197]</sup> (s. Abbildung 2-22 und Abbildung 3-1). Ein Laserstrahl wird durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur (NA) eines inversen Mikroskops in eine Probenlösung fokussiert. Das hier entstehende Fluoreszenzlicht wird wiederum von demselben Objektiv (*epi*-Fluoreszenz) aufgesammelt und über eine Tubuslinse auf eine Lochblende (auch Pinhole genannt) fokussiert. Im Detektionsstrahlengang nach der Lochblende wird das Licht wieder parallelisiert, durch einen Emissionsfilter geleitet, welcher Anregungs- von Emissionslicht trennt und (im einfachsten Fall) anschließend auf einem SPAD Detektor fokussiert. Im Falle von Kreuzkorrelationsexperimenten können auch zwei Detektoren in 90° Geometrie verwendet werden, hier wird das Emissionslicht mit Hilfe eines 50/50 Strahlteilers geteilt und auf die Detektoren geleitet. Der durch die Zählereignisse am Detektor ausgelöste Photonenstrom wird daraufhin entweder von einem Hardware-Korrelator oder von einem Algorithmus korreliert.

Das wohl wichtigste Element im FCS-Aufbau ist die Lochblende (Pinhole). Nur durch deren Einsatz ist es möglich, dass das konfokale Prinzip gewahrt wird und die Fluoreszenzfluktuationen ausreichend detektiert werden können.<sup>[189]</sup> Das konfokale Prinzip ist in untenstehender Abbildung erläutert. Der Laserstrahl regt nicht nur Fluoreszenz in der Fokalebene (grün gestrichelt) an, sondern auch oberhalb und unterhalb von ihr. Das Pinhole wird nun in die korrespondierende Fokalebene des Detektionsstrahlengangs eingebracht. Dadurch kann außerfokales Licht nicht auf den Detektor treffen, da dessen Brennpunkt entweder vor oder hinter dem Pinhole liegt. Durch das konfokale Prinzip kann also effektiv außerfokales Fluoreszenzlicht unterdrückt und somit das Signal-zu-Untergrund-Verhältnis stark verbessert werden.



**Abbildung 2-22** Illustration des Anregungs- und Detektionsstrahlengangs in einem FCS-Experiment sowie des konfokalen Prinzips.

### 2.4.1.2 Experimentelle Rahmenbedingungen

Ein Laserstrahl in der TEM<sub>00</sub>-Mode besitzt ein Intensitätsprofil, welches durch eine Gaußfunktion beschrieben werden kann. Wird dieser Laserstrahl nun durch ein Mikroskopobjektiv mit hoher Numerischer Apertur (NA) fokussiert, kann das von dem Laserstrahl erzeugte Anregungsvolumen in der Probelösung näherungsweise als gaußförmig in lateraler ( $r = r(x,y)$ ) und lorentzförmig in axialer (z-Richtung) Richtung betrachtet werden.<sup>[181,198]</sup> Daraus ergibt sich für die Beschreibung der Anregungsintensität  $I_A$ <sup>[181,199,200]</sup>:

$$I_A(r, z) = I_0 \frac{\omega_0^2}{\omega_z^2} \exp\left(-\frac{r^2}{\omega_z^2}\right) \quad (2.20)$$

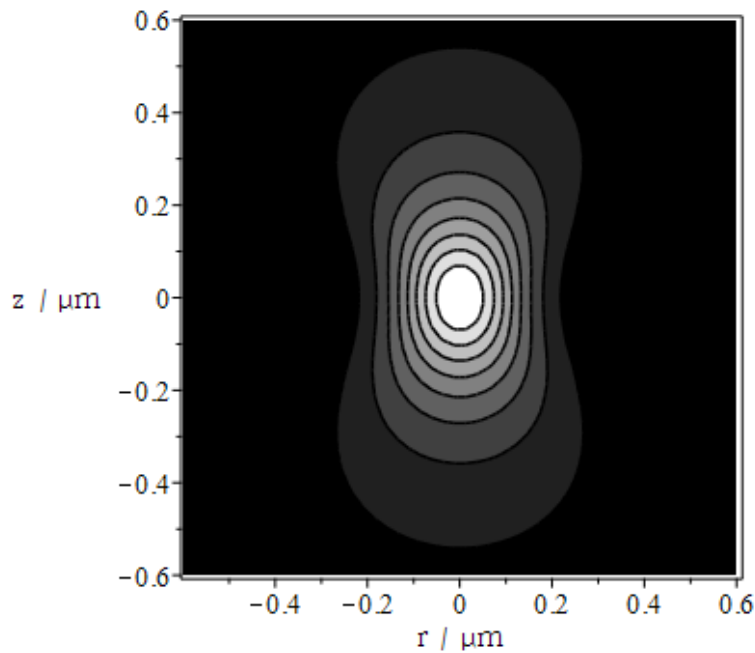
Mit

$$\omega_z^2 = \omega_0^2 + \left(\frac{\lambda}{n_0 \pi \omega_0}\right)^2 z^2 \quad (2.21)$$

Und

$$\omega_0 = \frac{2\lambda f}{n_0 \pi l} \quad (2.22)$$

Hierbei ist  $\omega_0$  der Strahlradius im Fokus des Anregungsvolumens. Dieser ist eine Funktion der Wellenlänge  $\lambda$  der Brennweite des Objektivs  $f$  dem Brechungsindex des Mediums  $n_0$  und dem Strahldurchmesser des Laserstrahls  $l$  vor Eintritt in das Objektiv.



**Abbildung 2-23** Darstellung des räumlichen Intensitätsverlaufs des Anregungsvolumens gemäß Gleichung (2.20) eines 63x Wasser Objektiv mit einer  $NA = 1.2$ , einem Strahldurchmesser von  $l = 4.16\text{mm}$  (s. Abschnitt 3.1.2.2) und einer Laserwellenlänge von  $\lambda = 470\text{ nm}$ . Die Ausmaße des Anregungsvolumens betragen  $r = 0.252\text{ }\mu\text{m}$  und  $z = 0.38\text{ }\mu\text{m}$ .

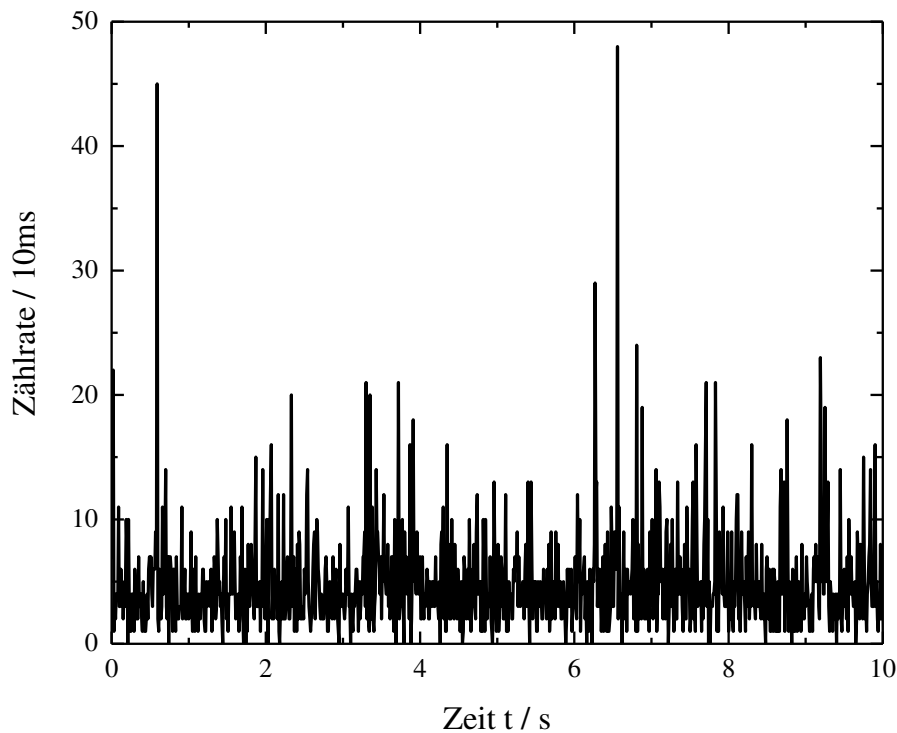
Der sich aus Gleichung (2.20) ergebende Intensitätsverlauf ist in Abbildung 2-23 dargestellt. In Wirklichkeit ist dieser jedoch wesentlich komplexer zu beschreiben und besitzt eine größere axiale Ausdehnung (s. Abbildung 3-4), lässt sich aber gut durch oben genannte Formel nähern. Um nur Photonen aus einem möglichst gaußförmigen Anregungsvolumen einzusammeln, wird als einfache Hilfskonstruktion eine Lochblende in den Detektionsstrahlengang des Aufbaus eingeführt.<sup>[189]</sup> Mathematisch lässt sich eine solche Lochblende über eine Stufenfunktion beschreiben. Mit Kenntnis dieser Stufenfunktion lässt sich die Einsammeleffizienz  $CEF$  und damit die  $MDF$  (Moleküldetektionsfunktion) herleiten.<sup>[201]</sup> Im Allgemeinen ist es in der FCS hinreichend die  $MDF$  mit Hilfe einer dreidimensionalen Gaußfunktion anzunähern<sup>[198]</sup>, auch wenn die tatsächliche Beschreibung der Punktspreizfunktion eines konfokalen Aufbaus wesentlich komplexer ist.<sup>[202]</sup>

$$MDF(r, z) \approx \exp\left(-2\left(\frac{r^2}{\omega_0^2} + \frac{z^2}{\omega_z^2}\right)\right) \quad (2.23)$$

Die gesuchte Größe  $I_{Fl}(t)$ , welche den am Detektor auftreffenden Photonenfluss beschreibt, hängt zum einen von der Konzentration  $C$  der Teilchen und zum anderen von deren Position  $\mathbf{r} = r(x, y, z)$  ab. Es kann also geschrieben werden:

$$I_{Fl}(\mathbf{r}, t) = MDF(\mathbf{r}) \cdot C(\mathbf{r}, t) \quad (2.24)$$

Nachfolgende Abbildung 2-24 zeigt das in einem oben beschriebenen Aufbau detektierte zeitliche Fluoreszenzsignal  $I_{Fl}(t)$  einer 0.1 nM Probe von Rhodamin 110 in PBS Puffer. Das aufgezeichnete Signal zeigt starke Fluktuationen. Diese stammen von Farbstoffmolekülen, die in das Anregungsvolumen, welches durch einen fokussierten Laserstrahl erzeugt wird, hinein und wieder heraus diffundieren.



**Abbildung 2-24** Zeitlicher Intensitätsverlauf einer 0.1 nM Rhodamin 110 Probe. ( $\lambda_{ex} = 470$  nm;  $f = 20$  MHz;  $\lambda_{em} = 525 \pm 50$  nm;  $P_{av} = 50$   $\mu$ W)

### 2.4.1.3 Autokorrelation

Wird das aufgezeichnete Signal einer Autokorrelationsanalyse gemäß Formel (2.19) unterzogen und die Funktion normiert, so wird die Fluoreszenzautokorrelationsfunktion (ACF, Gleichung (2.26))  $G(\tau)$  erhalten.

$$\psi(\tau) = \langle I_{Fl}(t) \cdot I_{Fl}(t + \tau) \rangle \quad (2.25)$$

$$G(\tau) = \frac{\psi(\tau)}{\langle I_{Fl}(t) \rangle^2} = \frac{\langle I_{Fl}(t) \cdot I_{Fl}(t + \tau) \rangle}{\langle I_{Fl}(t) \rangle^2} \quad (2.26)$$

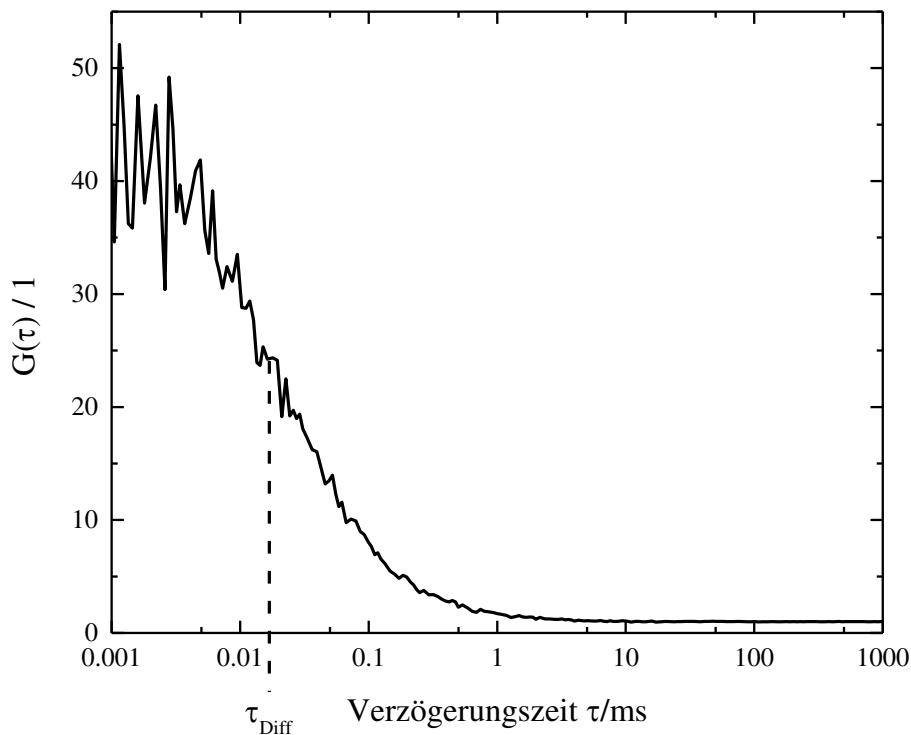
Die ACF kann nur hinreichend angewendet werden, wenn es sich bei dem analysierten Signal um ein stationäres Signal im Vergleich zur Verzögerungszeit  $\tau$  handelt. Das bedeutet, dass die Gesamtmessdauer  $t_{tot}$  sehr viel größer als  $\tau$  sein muss.<sup>[203]</sup>

Unten dargestellte Abbildung 2-25 zeigt das Ergebnis der ACF, angewendet auf den zeitlichen Fluoreszenzintensitätsverlauf der Rhodamin 110 Probe aus Abbildung 2-24. Wie bereits erwähnt, ist die ACF ein Maß für die Selbstähnlichkeit eines zeitlichen Signals. Daraus ergibt sich bei kurzen Verzögerungszeiten  $\tau$ , die kleiner sind als die mittlere Verweildauer eines fluoreszenten Moleküls im angeregten Volumen  $\tau_{Diff}$ , folgender Zusammenhang:

$$\langle I_{Fl}(t) \cdot I_{Fl}(t + \tau) \rangle \approx \langle I_{Fl}(t)^2 \rangle > \langle I_{Fl}(t) \rangle^2 \quad (2.27)$$

Das bedeutet für kurze Verzögerungszeiten  $\tau$  ist  $G(\tau) > 1$ . Bei großen Verzögerungszeiten  $\tau$  besteht keine Ähnlichkeit mehr zwischen  $I_{Fl}(t)$  und  $I_{Fl}(t + \tau)$ , da das betrachtete Teilchen wieder aus dem Anregungsvolumen diffundiert ist. Somit kann der Zähler in Gleichung (2.26) geschrieben werden als  $\langle I_{Fl}(t) \rangle \cdot \langle I_{Fl}(t + \tau) \rangle$ , womit sich  $G(\tau) = 1$  ergibt.





**Abbildung 2-25** Autokorrelationsfunktion, gewonnen aus dem zeitlichen Intensitätsverlauf aus Abbildung 2-24.

Bei Betrachtung von Abbildung 2-25 ist ersichtlich, dass die Amplitude der ACF  $G(0) \gg 1$  ist. Das Zustandekommen der Amplitude soll im nachfolgenden geklärt werden.

Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität kann auch als zeitliche Fluktuation der Intensität um deren Mittelwert aufgefasst werden.

$$I_{Fl}(t) = \langle I_{Fl} \rangle + \delta I_{Fl}(t) \quad (2.28)$$

Damit kann Gleichung (2.26) folgendermaßen umgeschrieben werden.

$$G(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta I_{Fl}(t) \cdot \delta I_{Fl}(t + \tau) \rangle}{\langle I_{Fl} \rangle^2} \quad (2.29)$$

In einem idealen Experiment entspricht die Fluoreszenzintensität  $I_{Fl}(t)$  genau dem Produkt der pro Molekül emittierten Photonen cpm (counts per molecule) und der Teilchenanzahl  $N$  im angeregten Volumen. Das bedeutet, dass alle Fluoreszenzfluktuationen nur

aus dem Diffusionsverhalten der Moleküle im angeregten Volumen stammen. Aus diesem Grund können genauso gut nur die Teilchenzahlen  $N$  betrachtet werden und eine Teilchenfluktuations ACF formuliert werden

$$G(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta N(t) \cdot \delta N(t + \tau) \rangle}{\langle N \rangle^2} \quad (2.30)$$

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Moleküle  $N$  einer Poisson-Statistik<sup>[204]</sup> gehorchen und dass bei der Poisson-Statistik die Varianz  $\langle \delta N(t)^2 \rangle$  dem Erwartungswert  $\langle N \rangle$  entspricht, ergibt sich für die Amplitude der ACF:

$$G(0) = 1 + \frac{\langle \delta N(t)^2 \rangle}{\langle N \rangle^2} = 1 + \frac{\langle N \rangle}{\langle N \rangle^2} = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle} \quad (2.31)$$

Das bedeutet, in der Amplitude der ACF spiegelt sich direkt die Anzahl der sich im Anregungsvolumen befindlichen Teilchen wieder.

Gleichung (2.26) und (2.30) liefern zwar die mathematische Vorschrift, wie die ACF gebildet wird, es fehlt jedoch noch an einem Ausdruck, der aus einer ACF physikochemische Informationen extrahiert. Durch Einsetzen von Gleichung (2.24) in Gleichung (2.26) kann unter Zuhilfenahme des zweiten Fick'schen Gesetzes das passende Modell gefunden werden, das die Autokorrelationsfunktion eines in drei Dimensionen frei in Lösung diffundierenden Moleküls beschreibt.<sup>[181,205]</sup>

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} + \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{Diff}}} + \frac{1}{\sqrt{1 + \kappa^2 \frac{\tau}{\tau_{Diff}}}} \quad (2.32)$$

Aus der Amplitude lassen sich die Konzentration  $c$  der Fluorophore bzw. das Detektionsvolumen  $V_{eff}$  bestimmen

$$N = cV_{eff}N_A \quad (2.33)$$

mit

$$V_{eff} = \kappa \omega_0^3 \pi^{3/2} \quad (2.34)$$

Die mittlere Aufenthaltsdauer oder Diffusionszeit  $\tau_{Diff}$  gibt Aufschluss über den Diffusionskoeffizienten  $D$  des Fluorophors.

$$\tau_{Diff} = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad (2.35)$$

Der Faktor  $\kappa$  beschreibt die Geometrie des Detektionsvolumens.

$$\kappa = \frac{\omega_z}{\omega_0} \quad (2.36)$$

Neben dem oben beschriebenen Modell gibt es eine Vielzahl von weiteren Modellen, welche zur Auswertung der ACF herangezogen werden können. Sie alle enthalten zusätzliche Terme ( $X(\tau)$  in Gleichung (2.37)), welche bspw. Protonierungsreaktionen<sup>[206]</sup>, Triplettübergänge<sup>[194]</sup>, Konformationsänderungen<sup>[192,207]</sup> oder anomales Diffusionsverhalten<sup>[208]</sup> beschreiben. Diese können allgemein als Produkt mit dem Diffusionsterm geschrieben werden.

$$G_{tot}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} G(\tau) X(\tau) \quad (2.37)$$

Prinzipiell ist es möglich, eine Mischung unterschiedlicher Fluorophore durch konventionelle FCS voneinander zu trennen. Zum einen, wenn die Fluorophore unterschiedliche Wellenlängen emittieren, so dass die Fluoreszenz durch den Einsatz unterschiedlicher Filter voneinander separiert werden kann. Zum anderen, sofern sich ihre Diffusionskoeffizienten genügend voneinander unterscheiden.<sup>[209]</sup> Eine Herausforderung besteht, wenn

sich die vorhandenen Spezies stark in ihren Quantenausbeuten unterscheiden. Dann ist die Autokorrelationsfunktion einer Mischung mehrerer, nicht miteinander interagierender Fluorophore gegeben durch nachfolgende Gleichung.<sup>[181]</sup>

$$G_{tot}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{\sum_i Y_i \phi_i^2 G_i(\tau)}{(\sum_i Y_i \phi_i)^2} = 1 + \frac{1}{N_{app}} G_i(\tau) \quad (2.38)$$

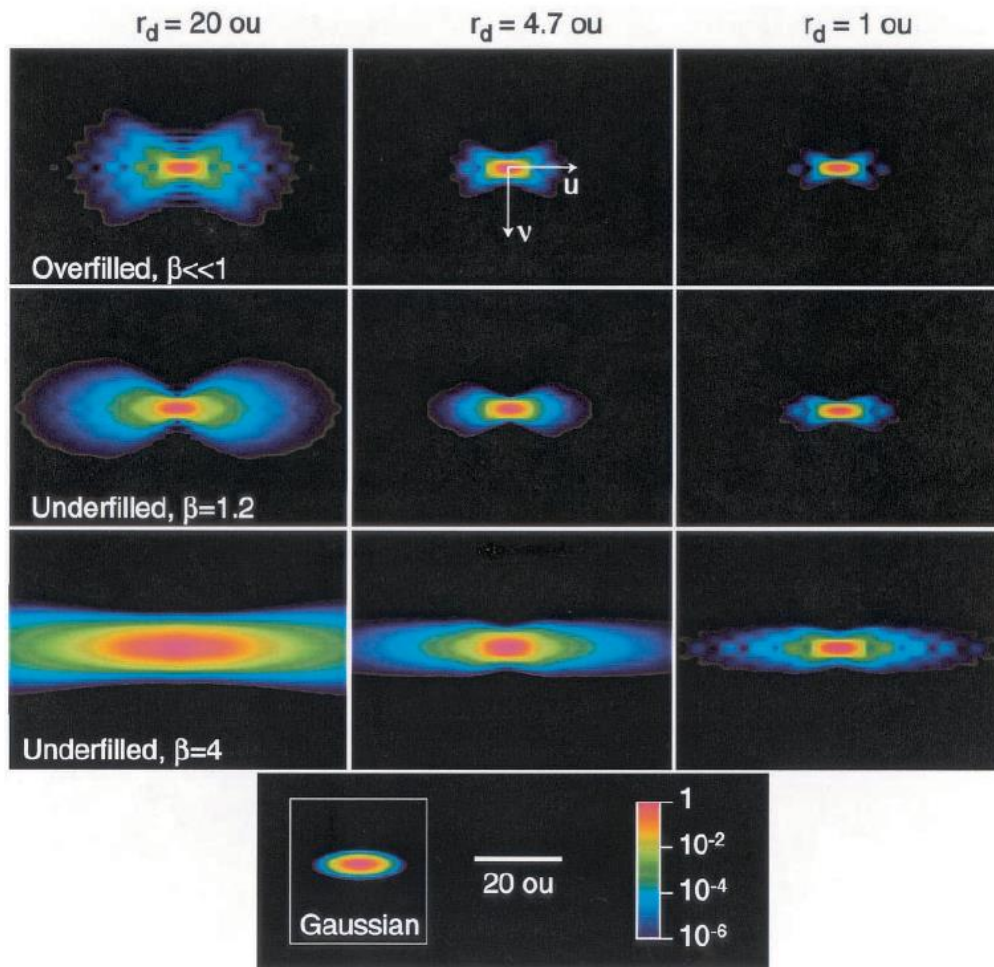
Wichtig hierbei ist, dass die Quantenausbeuten, also die Helligkeiten der Fluorophore eine Auswirkung auf die experimentell wahrgenommene Gesamtteilchenzahl ( $N_{app}$ ) hat, da die Quantenausbeuten der jeweiligen  $i$ -ten Spezies quadratisch die Autokorrelationsfunktion  $G_i(\tau)$  beeinflussen. Der Faktor  $Y_i$  steht für den Anteil der Spezies  $i$  an der Gesamtteilchenzahl  $N$ .

#### 2.4.1.4 Artefakte und experimentelle Schwierigkeiten

Die optimalen Detektions- und Anregungsbedingungen für einen gegebenen Fluorophor zu finden ist nicht trivial. Nicht nur verschlechtert ein nicht ausreichend justiertes Experimentelles Set-Up das Signal-zu-Untergrund Verhältnis, sondern es verzerrt auch die *MDF*, was zu einer großen Abweichung von der gaußförmigen Detektionsgeometrie führen kann. Das hat wiederum zur Folge, dass Informationen im Rauschen verloren gehen bzw. dass die verwendeten Modelle zur Datenanalyse stark fehlerbehaftet oder sogar vollkommen ungeeignet sind.

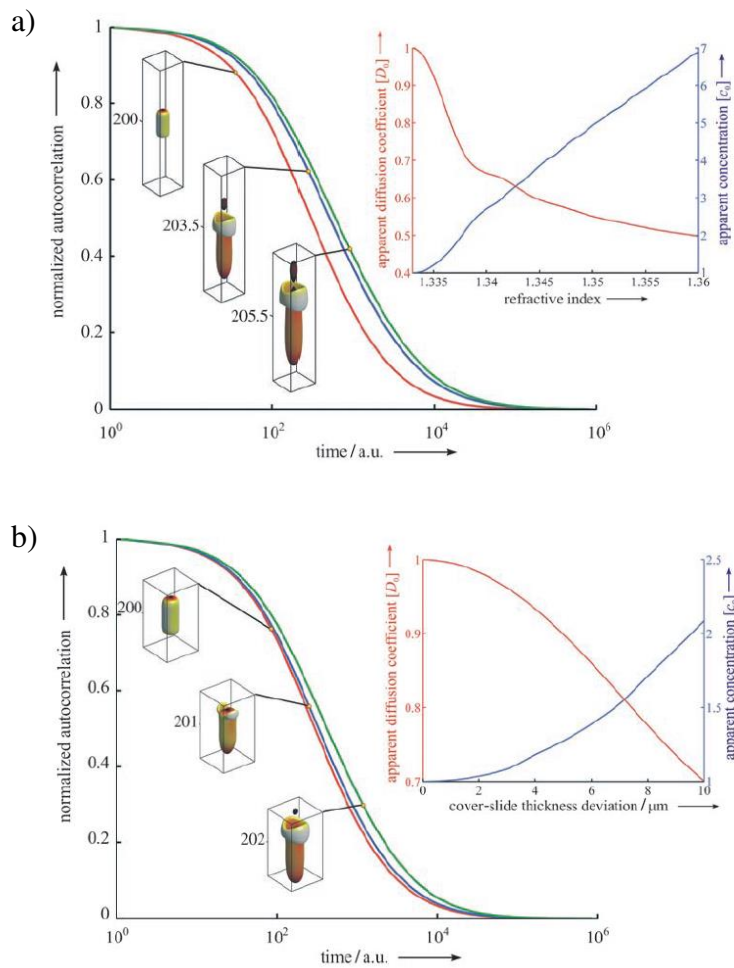
Einflussfaktoren auf das Aussehen der *MDF* sind vielzählig und können einen mehr oder weniger starken Einfluss auf diese haben. Bei Kenntnis dieser Faktoren lässt sich das Aussehen der *MDF* aber recht gut kontrollieren. Enderlein<sup>[202]</sup> und Hess<sup>[198]</sup> haben hierzu ausführliche numerische Berechnungen durchgeführt, unter welchen experimentellen Bedingungen die *MDF* am ehesten mit einer Gaußfunktion genähert werden kann. Diese Ergebnisse müssen bei einem sorgfältig geplanten Design eines Experimentes berücksichtigt werden. Die erste Hürde ist die Wahl des Strahldurchmessers vor dem Objektiv und die Wahl eines passenden Pinholes. Die sogenannte *underfilling fraction*  $\beta$  beschreibt das Verhältnis von Strahldurchmesser zur rückwärtigen Apertur des Objektivs. Hess *et al.* beschreiben, dass ein  $\beta = 1.2$  (also eine nicht ganz ausgefüllte Rückapertur) sowie ein Pinhole von einem Radius von ungefähr 5 o.u. (*optical units*, das entspricht einem Pinhole

mit einem Radius von ca. 20  $\mu\text{m}$  bei einem Fluorophor mit  $\lambda_{em,max} = 515 \text{ nm}$  und einem 63x 1.2NA Objektiv) ein nahezu Gaußförmiges Detektionsvolumen ergeben.



**Abbildung 2-26** Die Ergebnisse der numerischen Simulationen von Hess *et al.*<sup>[198]</sup> Die Simulationen zeigen den Intensitätsverlauf der *MDF* eines 1.2 NA Objektivs in axialer (u) und lateraler (v) Richtung. Zum Vergleich ist ein ideales Gaußvolumen gezeigt.

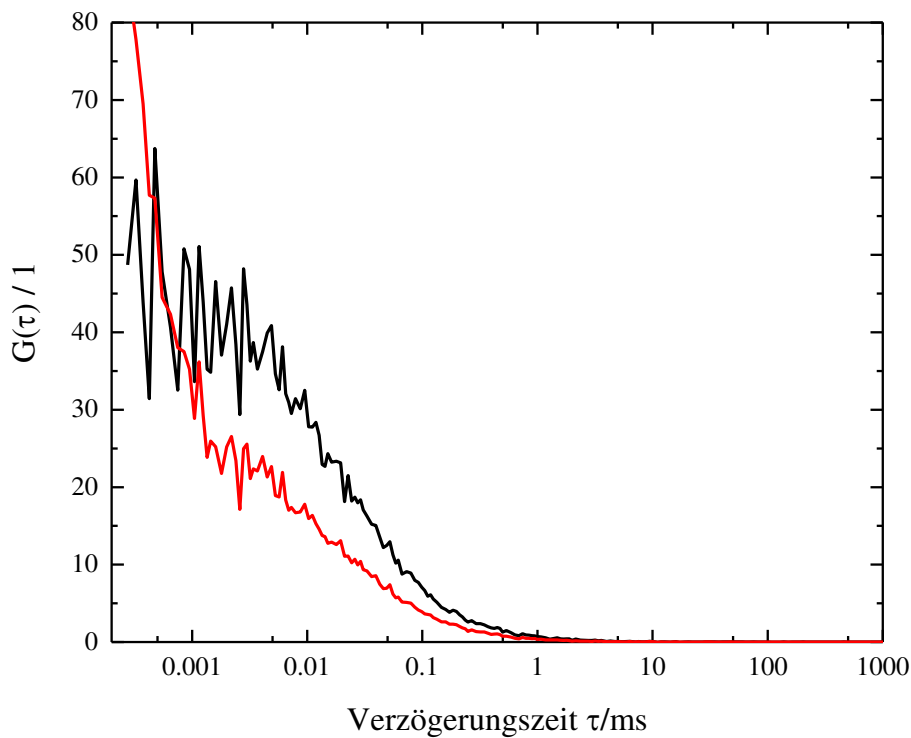
Weitere wichtige Einflussgrößen auf ein nicht-Gauß'sches Aussehen der MDF sind der Unterschied im Brechungsindex zwischen Immersionsflüssigkeit des Objektivs und Probe, sowie die Dicke des verwendeten Deckglases (s. Abbildung 2-27). Moderne Objektive besitzen einen sogenannten *correction collar*, mit dem das Objektiv auf die Dicke des Deckglases eingestellt werden kann.



**Abbildung 2-27** Die Graphiken zeigen die Ergebnisse der numerischen Simulationen von Enderlein *et al.*<sup>[202]</sup> wie sich das Aussehen der *MDF* und damit die ACF verändert bei a) unterschiedlichen Brechungsindizes und b) unterschiedlicher Deckglasdicke.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der berücksichtigt werden muss, ist die Anregungsintensität. Einerseits führen hohe Anregungsintensitäten zu Prozessen wie Photobleaching, welche die ACF zu kürzeren Diffusionszeiten verschiebt und die Fluorophore zerstört, andererseits kann es aber auch zu optischen Sättigungseffekten kommen. Diese führen zu einem scheinbar größeren Detektionsvolumen. Diesen Effekten ist aber leicht entgegen zu wirken, indem bei geringen bis moderaten Anregungsintensitäten gemessen wird. Um die optimale Anregungsintensität zu identifizieren, wird die Zählrate am Detektor gegen die variierende Anregungsintensität aufgetragen und die Intensität gewählt, bevor die Zählrate in die Sättigung geht.

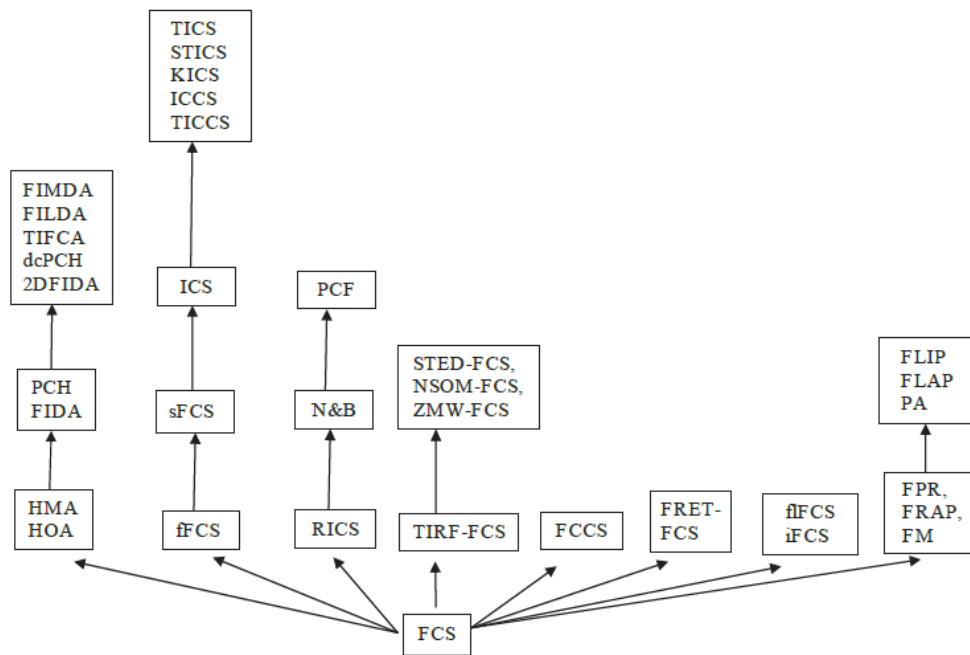
Ein weiteres Artefakt, welches immer wieder auftritt, jedoch nichts mit der Form der *MDF* zu tun hat, ist das sogenannte *Afterpulsing*. Dabei handelt es sich um einen Effekt bei SPAD Detektoren, der die ACF bei kurzen Zeiten verzerrt. In Abbildung 2-28 ist dieser Effekt dargestellt. Afterpulsing entsteht durch die thermisch induzierte Freisetzung von Ladungsträgern, die nach einem echten Puls in dem p-n- Übergang des Halbleiters gefangen sind. Werden diese Ladungsträger freigesetzt, kommt es zur Erzeugung neuer Ladungsträger, welche ein neues Zählereignis auslösen. Dieses korreliert mit dem ursprünglichen Zählereignis.<sup>[210]</sup> Es gibt zwei Möglichkeiten, Afterpulsing zu unterdrücken. Da die Afterpulsing-Ereignisse zweier unterschiedlicher Detektoren nicht korreliert sind, kann zur Aufnahme einer ACF ohne Afterpulsing ein zweiter Detektor herangezogen und die Zählereignisse der Detektoren kreuzkorreliert werden. Als weitere Möglichkeit kann mit Hilfe von FLCS Afterpulsing unterdrückt werden; auf diese experimentelle Weiterentwicklung der FCS soll in Abschnitt 2.4.2 eingegangen werden.



**Abbildung 2-28** ACF einer 0.1 nM Rhodamin 110 Probe ( $\lambda_{ex} = 470$  nm;  $f = 20$  MHz;  $\lambda_{em} = 525 \pm 50$  nm;  $P_{av} = 50$   $\mu$ W) ohne Afterpulsing (schwarz) und mit Afterpulsing (rot).

### 2.4.1.5 Anwendungen und Weiterentwicklungen

Wie bereits erwähnt, lassen sich eine Vielzahl von Größen und Dynamiken aus FCS-Messungen gewinnen. Neben der simpelsten Messung von Diffusionskoeffizienten und Konzentrationen, lassen sich Photostabilitäten<sup>[211]</sup>, Intersystemcrossingraten<sup>[194]</sup>, Protomerisierungsraten (inter- und intramolekular)<sup>[193,212]</sup>, Konformationsänderungen<sup>[195]</sup> von Molekülen und sogar quantenmechanische Effekte, wie das sogenannte Antibunching<sup>[212,213]</sup> studieren. Technische Neuerungen und Weiterentwicklungen erschließen neue Möglichkeiten und neue Messgrößen. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Varianten der klassischen FCS (s. Abbildung 2-29), z.B. 2-Focus-FCS<sup>[214]</sup> (2fFCS), Zwei-Photonenanregung FCS<sup>[215]</sup> (2PEFCS) oder wie Scanning<sup>[216–219]</sup> und Imaging FCS<sup>[52,218]</sup>, die nicht nur zeitliche, sondern auch räumliche Fluoreszenzfluktuationen analysieren können.



**Abbildung 2-29** Stammbaum der aus FCS entwickelten Korrelationstechniken. Entnommen aus Elliot L. Elson, 40 Years of FCS: How It All Began.<sup>[220]</sup>

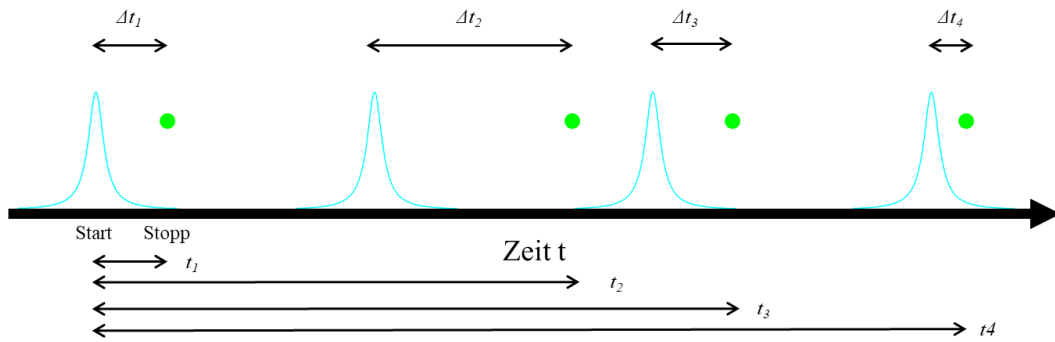


## 2.4.2 Fluoreszenzlebensdauer–Korrelationsspektroskopie – FLCS

Die Fluoreszenzlebensdauer-Korrelationsspektroskopie stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen FCS dar. Hier wird der Analyse der Fluoreszenzfluktuationen eine weitere Dimension hinzugefügt. In der klassischen FCS können Fluorophore nur unterschieden werden, wenn sich ihre Diffusionskoeffizienten hinreichend unterscheiden oder wenn sie spektral durch Emissionsfilter getrennt werden können.<sup>[209]</sup> Die FLCS ermöglicht es jedoch auch, diese Moleküle anhand ihrer Fluoreszenzlebensdauer zu unterscheiden und für jedes Teilchen mit unterschiedlicher Fluoreszenzlebensdauer eine eigene ACF zu erzeugen.<sup>[221]</sup> Technisch muss ein klassisches FCS Experiment um einen TCSPC Aufbau erweitert werden, d.h. es muss zum Einsatz eines gepulsten Lasers und einer TCSPC Zählereinheit kommen. Den ersten praktischen<sup>[210]</sup> und theoretischen<sup>[222]</sup> Vorschlag für ein solches Set-Up wurde im Jahre 2005 bzw. 2001 von Enderlein *et al.* gemacht. In den nachfolgenden Jahren wurde dieses Prinzip näher beschrieben und weiterentwickelt. Nachfolgend sollen die experimentellen und theoretischen Bedingungen für die Anwendung der FLCS dargestellt werden.

### 2.4.2.1 Experimentelle und theoretische Grundlagen

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei der FLCS um eine Kombination von TCSPC und FCS. Mit Hilfe dieser Kombination und einer Aufnahmetechnik namens *time-tagged time recorded* (TTTR)<sup>[223]</sup> können jedem auf dem Detektor auftreffenden Photon zwei Zeiten zugeordnet werden (s. Abbildung 2-30). Einmal eine sogenannte Mikro- und einmal eine sogenannte Makrozeit (oder Globale Zeit). Erstere, die Mikrozeit, gibt die Zeit eines Photons in Bezug auf den Laserpuls an und liefert über N Pulse den entsprechenden Fluoreszenzzerfall des Fluorophors. Wie bei der klassischen FCS gibt letztere, die Makrozeit, die Ankunftszeit eines Photons in Bezug auf den Start des Experimentes an.



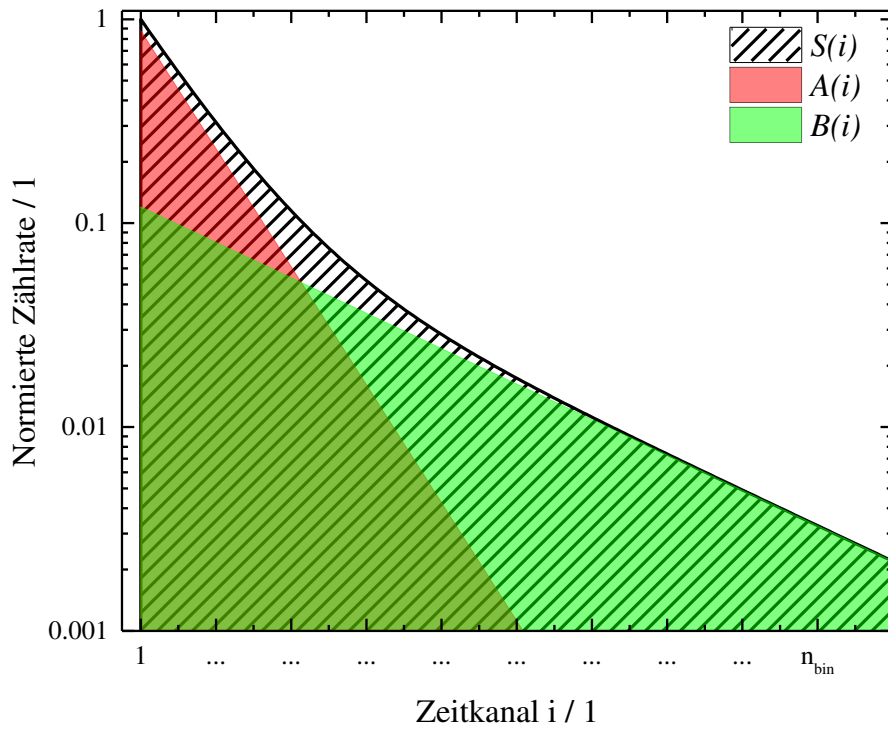
**Abbildung 2-30** Prinzip des TTTR Modus für die Aufnahme von FLCS Daten. Jedem Photon (grün) werden zwei Zeiten zugeordnet, zum einen die Mikrozeiten  $\Delta t$  in Bezug auf den Laserpuls, zum andern die Makrozeiten  $t$  in Bezug auf den Start des gesamten Experimentes.

In der FLCS werden nun sogenannte statistische Filter  $f$  aus den Fluoreszenzzerfallsdaten erzeugt. Werden diese gemäß Gleichung (2.39) mit der ACF multipliziert, werden die fluorophorspezifischen ACF erhalten.<sup>[221,224]</sup>

$$G_{A,B}(\tau) = \frac{\sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^N f_j^A f_k^B \langle I_{FL,j}(t) I_{FL,k}(t + \tau) \rangle}{\sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^N f_j^A f_k^B \langle I_{FL,j} \rangle \langle I_{FL,k} \rangle} \quad (2.39)$$

Die gegebene Funktion spiegelt den Fall von zwei Fluorophoren (A, B) mit unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern wider. Es können sowohl ACF der einzelnen Spezies, als auch Kreuzkorrelationsfunktionen CCF zwischen den Spezies berechnet und auf eine willkürliche Anzahl von Spezies erweitert werden.

Um FLCS anwenden zu können, müssen also die statistischen Filter  $f$  erzeugt werden. Dies geschieht auf rein mathematischem Wege aus den *a priori* bekannten experimentell ermittelten Fluoreszenzzerfällen der jeweiligen Fluorophore. Die Filter können aber auch durch passende multiexponentielle Anpassungsmodelle berechnet werden. Es ist zu erwähnen, dass es prinzipiell ausreicht n-1 Zerfälle zu kennen, da sich daraus automatisch der n-te Zerfall ergibt.<sup>[225]</sup> Dies ist vor allem in Fällen wichtig, in denen der Fluoreszenz-Zerfall einer Spezies nicht bekannt ist oder nicht modelliert werden kann.



**Abbildung 2-31** Ein biexponentieller Zerfall (schwarz, schraffiert) kann als Linearkombination zweier monoexponentieller Zerfälle (Grün und Rot) beschrieben werden.

Eine Lösung von zwei Fluorophoren A und B mit unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern und Quantenausbeuten liefert als experimentellen Fluoreszenzzerfall  $S(i)$  eine Linearkombination der Fluoreszenzzerfälle der einzelnen Spezies. In Abbildung 2-31 ist ein simulierter biexponentieller Zerfall (nach Gleichung (2.40)) und seine ihm zu Grunde liegenden monoexponentiellen Zerfälle gezeigt.

$$S(i) = A(i) + B(i) = 0.88 \exp\left(-\frac{i}{1.5 \text{ ns}}\right) + 0.12 \exp\left(-\frac{i}{5 \text{ ns}}\right) \quad (2.40)$$

Um die Rechnungen zu vereinfachen, wird der Zerfall  $S$  in Abhängigkeit des korrespondierenden Zeitkanals  $i$  dargestellt. Die mikroskopische Zeit zwischen Laserpuls und Photon berechnet sich durch Multiplikation der Zeitkanalanzahl  $n_{bin}$  mit der zeitlichen Auflösung des Experiments.

$$S(i) = w_a a(i) + w_b b(i) \quad (2.41)$$

Hierbei gilt die Normalisierung:

$$a(i) = \frac{A(i)}{\sum A(i)} ; \quad b(i) = \frac{B(i)}{\sum B(i)} \quad \text{und} \quad \sum a(i) + \sum b(i) = 1 \quad (2.42)$$

Die Faktoren  $w_a$  und  $w_b$  bezeichnen die Anzahl der von Zerfall A bzw. B stammenden Photonen. Es sollen nun Filterfunktionen  $f(i)$  definiert werden, die genau diese Faktoren berechnen, so dass über eine unendliche Anzahl von Messungen gemittelt gilt:

$$\langle \sum f_a(i) S(i) \rangle = w_a \quad \text{bzw.} \quad \langle \sum f_b(i) S(i) \rangle = w_b \quad (2.43)$$

Enderlein *et. al.* konnten zeigen, dass sich diese Filter leicht durch Matrixoperationen berechnen lassen unter der Annahme, dass die Photonenevents einer Poisson-Verteilung gehorchen<sup>[210,222,226]</sup>.

$$\begin{bmatrix} f_a \\ f_b \end{bmatrix} = \left( \begin{bmatrix} a \\ b \end{bmatrix} \mathbf{D} \begin{bmatrix} a \\ b \end{bmatrix}^T \right)^{-1} \begin{bmatrix} a \\ b \end{bmatrix} \mathbf{D} \quad (2.44)$$

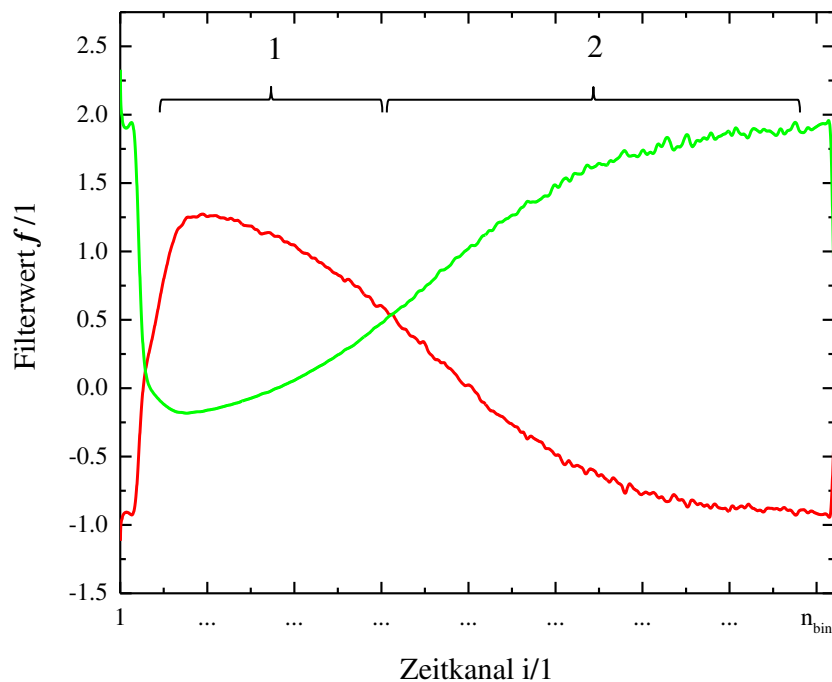
Die Filter und Zerfälle wurden hier als Reihenvektoren der Länge N dargestellt mit den Elementen  $f_a(i)$  ( $a(i)$ ) bzw.  $f_b(i)$  ( $b(i)$ ) und  $\mathbf{D}$  entspricht der NxN-Diagonalmatrix der reziproken Werte für  $S(i)$ .

$$\mathbf{D} = \begin{bmatrix} \frac{1}{S(1)} & 0 & \dots & 0 \\ 0 & \frac{1}{S(2)} & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & \frac{1}{S(N)} \end{bmatrix} \quad (2.45)$$

Wichtig für die Berechnung ist, dass die Filter  $\mathbf{f}$  zusammen in einer Matrixoperation berechnet werden. So ist sichergestellt, dass die notwendige Orthonormalität erfüllt ist und es gilt:

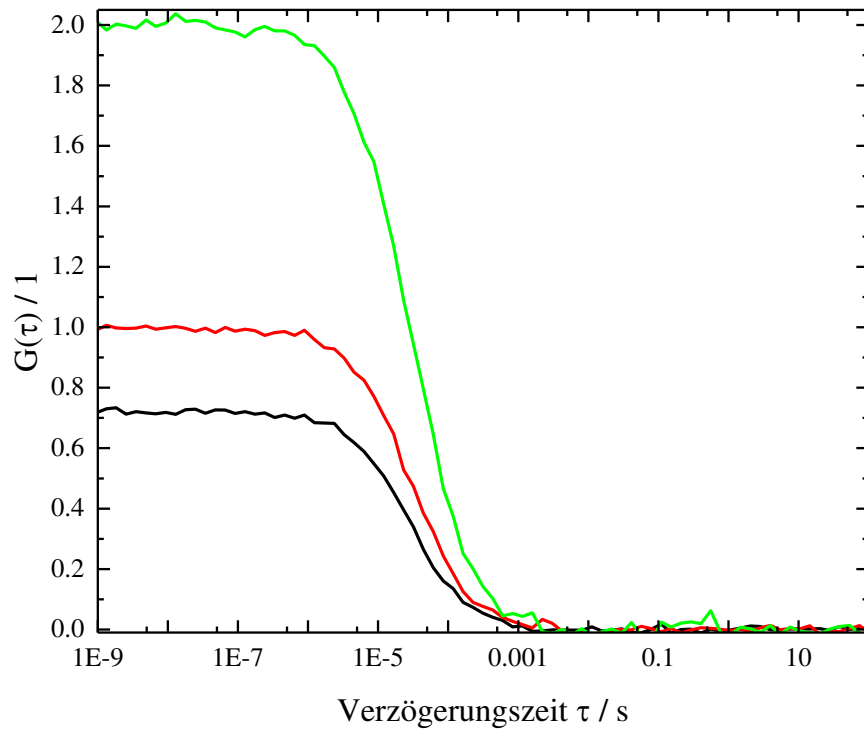
$$f_a a = f_b b = 1 \wedge f_a b = f_b a = 0 \quad (2.46)$$

Die Bedeutung von  $f$  liegt darin, dass diese statistischen Filter oder Gewichtungsfunktionen jedem detektierten Photon einen Wert zuordnen, der Informationen darüber enthält, wie wahrscheinlich ein Photon dem Zerfall des Fluorophors A bzw. B zugeordnet werden kann.<sup>[221]</sup>



**Abbildung 2-32** Darstellung zweier Filterfunktionen für die monoexponentiellen Zerfälle aus Abbildung 2-31. Rot bezeichnet den Filter  $f_a$  für den Zerfall A und grün den Filter  $f_b$  für Zerfall B. Photonen, die in den Zeitkanälen, markiert durch die Bereiche 1 und 2 registriert werden, haben eine höhere Wahrscheinlichkeit, zum Zerfall A bzw. B zu gehören.

Abbildung 2-32 zeigt die nach Gleichung (2.44) aus den Zerfällen  $A(i)$  und  $B(i)$  (Abbildung 2-31) gewonnenen Filterfunktionen  $f_a$  und  $f_b$ . Die Filterfunktionen sind so konstruiert, dass bei Multiplikation dieser mit dem biexponentiellen Zerfall  $S(i)$  die monoexponentiellen Zerfälle  $A(i)$  bzw.  $B(i)$  erhalten werden. Werden diese Filter auf die Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  angewendet, die sich aus der Korrelation des zeitlichen Fluoreszenzverlaufs  $I_{Fl,S}(t)$  der Mischung  $S$  ergibt, werden zwei für die Spezies A und B spezifische Korrelationsfunktionen erhalten.



**Abbildung 2-33** Simulierte FLCS Kurven für das Signal  $S$ , dass sich aus den beiden fluoreszenten Spezies A und B ergibt.

In Abbildung 2-33 schwarz dargestellt ist die simulierte Autokorrelationsfunktion der  $G_S(\tau)$  der Mischung  $S$ . Nach Anwendung der Filterfunktionen ergibt sich nach Gleichung (2.39)

$$G_{A/B}(\tau) = f_{A/B} G_S(\tau) \quad (2.47)$$

die entsprechenden speziesspezifischen Autokorrelationsfunktionen  $G_A(\tau)$  (rot) und  $G_B(\tau)$  (grün).

Bei der Simulation wurde angenommen, dass in einem Volumen von  $V_{eff} = 0.13$  fL mit  $N_A = 1$  Teilchen der Spezies A und  $N_B = 0.5$  Teilchen der Spezies B mit einem Diffusionskoeffizienten  $D = 470 \mu\text{m}^2/\text{s}$  angeregt werden. Normalerweise sollte die beobachtete Teilchenanzahl der Mischung  $N_S = 1.5$  betragen und nicht wie in obiger Abbildung 2-33 zu erkennen  $N_{S,sim} = 1.39$ .

Grund für diese Diskrepanz sind die anfangs erwähnten unterschiedlichen Quantenausbeuten der Fluorophore. Das führt laut Gleichung (2.38) zu der dort beschriebenen scheinbaren Gesamtteilchenzahl. Diese kann sich sehr stark von der echten Gesamtteilchenzahl unterscheiden.

Da es sich um eine rein statistische Verfahrensweise handelt, wird die Separierung der Autokorrelationsfunktionen einer Mischung von Fluorophoren unterschiedlicher Lebensdauer umso besser, je mehr Photonen aufgesammelt und korreliert werden.<sup>[53,227]</sup> In einem normalen FCS bzw. FLCS Experiment werden jedoch in der Regel genügend Photonen detektiert, so dass die Separierung gut verläuft. Theoretische Rechnungen und Simulationen konnten sogar zeigen<sup>[224]</sup>, dass schon  $5 \times 10^3$  Photonen ausreichen können um die Autokorrelationsfunktionen mit einem relativen Fehler von 10% bzgl. der Amplituden zu separieren.

Einfacher als die Trennung von zwei (oder mehreren) Fluorophoren ist die Separierung des echten Fluoreszenzsignals von Detektorartefakten (Afterpulsing), Untergrund und parasitären Beiträgen zur Fluoreszenzintensität wie Ramanstreuung.<sup>[227]</sup> Die in Abbildung 2-28 schwarz dargestellte ACF wurde durch ebendiese statistische Filterung erzeugt, indem sie das wahre Fluoreszenzsignal von Afterpulsing, Ramanstreuung und Untergrundlicht befreit.

Die nach den oben aufgezeigten Prinzipien berechneten statistischen Filter sind nicht nur beschränkt auf die Zeitdomäne wie in der FLCS. Die Gruppe um Claus Seidel konnte einen allgemeineren Ansatz zeigen und die mathematischen und experimentellen Grundlagen für die filtered-FCS (fFCS)<sup>[54,224]</sup> legen. Dadurch lässt sich ein FCS Experiment um einen oder beliebig viele Kanäle erweitern und Fluorophore beispielsweise spektral oder nach ihrer Polarisation trennen.

### 2.4.2.2 Anwendungen und praktische Limitierungen

Bei der FLCS handelt es sich noch um eine relativ junge Technik, deren Grundlagen im Jahre 2002 von Böhmer *et al.* gelegt wurden.<sup>[222]</sup> Mittlerweile konnte die Fähigkeit der FLCS, speziesspezifische ACF zu liefern in einer Vielzahl von Anwendungen unter Beweis gestellt werden:

Padilla-Parra *et al.* konnten zeigen, dass die Verbindung von FLCS und Zwei-Farben-FCCS die Interaktion von EGFP und mCherry markierten Proteinen in lebenden Zellen abbilden kann, ohne dass es einer zusätzlichen Korrektur von spektralen Crosstalk bedarf.<sup>[228]</sup> Mit einem ähnlichen Ansatz konnten Chen *et al.* die Interaktion von EGFR und seinen Antagonisten in lebenden HEK293 Zellen charakterisieren und quantifizieren.<sup>[229]</sup> Mit Hilfe dieses Ansatzes war es Paredes *et al.* möglich, Einblicke in die Dynamik der Oligomerisierung der SH3-Domäne des Proteins  $\alpha$ -Spectrin zu geben. Dieses steht mit der Bildung von Amyloid-Fibrillen im Zusammenhang.<sup>[230]</sup>

Ein weiteres interessantes Beispiel für die Anwendung von FLCS ist die Aufklärung der von Spermin bzw. CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) induzierten Faltung von zirkulärer und linearer DNA. Humpolíčková *et al.* markierten die DNA mit einem fluoreszenten Farbstoff und konnten durch die Analyse der FLCS ACF und CCF zeigen, dass in Gegenwart von Spermin die Faltung der DNA in einem Schritt abläuft, wohingegen die CTAB induzierte Faltung graduell von statten geht.<sup>[225,231,232]</sup>

Mit Hilfe der FLCS lassen sich auch Ratenkonstanten chemischer und photophysikalischer Prozesse bestimmen. I. Gregor und J. Enderlein konnten an Hand eines Cy5 markierten Streptavidin Komplexes zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, die Ratenkonstanten von Übergängen zwischen zwei fluoreszierenden Spezies mit gleichen Emissionseigenschaften aber unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern zu bestimmen.<sup>[221]</sup> Ausgehend davon konnten Paredes *et al.* FLCS nutzen, um den Einfluss verschiedener Puffersysteme und Ionen auf die Ratenkonstanten des Protonentransfers im angeregten Zustand (ESPT) sowie im Grundzustand (GSPT) des Farbstoffes Tokyo Green II (TG-II) zu bestimmen.<sup>[233,234]</sup> Ghosh *et al.* konnten so mit Hilfe von FLCS die Ratenkonstanten der Interkonversion zweier fluoreszenter EGFP Spezies bestimmen.<sup>[235]</sup>



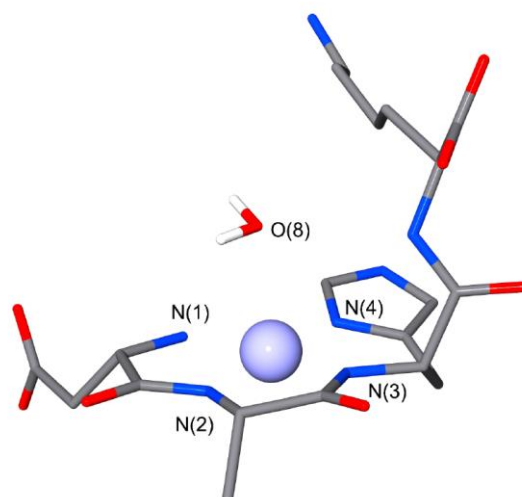
Die FLCS stellt eine mittlerweile sehr robuste Messmethode dar, welche mit nur wenig mehr experimentellem und analytischem Aufwand eine Vielzahl neuer Einblicke gewährt. Die Leichtigkeit, mit der typische Probleme und Artefakte der klassischen FCS und vor allem der Zwei-Farben-FCCS umgangen werden können, macht die FLCS zu einem mächtigen Werkzeug. Bei allen Vorteilen, welche die FLCS zwar bietet, unterliegt sie – wie jede experimentelle Methode – einigen Limitierungen. Wie vorher schon einmal erwähnt reichen theoretisch eine recht geringe Anzahl von korrelierten Photonen aus (ca.  $5 \times 10^3$ ), um die ACFs genügend voneinander zu trennen. Auch dem mathematischen Modell hinter der FLCS sind theoretisch keine Grenzen gesetzt, was die Anzahl der Spezies, die separiert werden, oder was die Differenz in den Lebensdauern angeht.<sup>[53]</sup> In einem Experiment in der realen Welt kann dies allerdings nicht bewerkstelligt werden. Standardmäßig ist es eigentlich immer möglich, vier Komponenten voneinander zu trennen. Allein schon bei der Separierung zweier Farbstoffe, wie von Rüttinger *et al.* gezeigt<sup>[227]</sup>, ist es trivial, eine Streukomponente und Untergrundkomponente von den eigentlichen Signalen abzutrennen. Wie viele „echte“ Farbstoffsignale abgetrennt werden können und wie sehr sich diese in ihren Lebenszeiten unterscheiden müssen, lässt sich aber nicht pauschal beantworten und muss von Experiment zu Experiment separat geklärt werden. Ultimativ läuft die Trennung der Signale aber auf deren Qualität hinaus. Das bedeutet zum einen, je mehr Photonen zur Erzeugung der Filterfunktionen und zur Berechnung der Korrelationsfunktionen herangezogen werden können und je kleiner das zeitliche Auflösungsvermögen des experimentellen Aufbaus, ist desto besser und genauer können die Spezies voneinander getrennt werden. Die eigentliche Limitierung der Methode liegt also in der maximalen Anzahl an Photonen, dem zeitlichen Auflösungsvermögen der elektronischen Komponenten und der Empfindlichkeit des Detektors.

## 2.5 Design des Sensors

Bei dem Design des Sensors mussten verschiedene Gesichtspunkte betrachtet werden, um ein Molekül mit den gewünschten Eigenschaften zu schaffen:

1. Geringes Molekulargewicht und damit einhergehender geringer hydrodynamischer Radius.
2. Eine  $K_D$  im unteren pikomolaren Bereich bei physiologischen pH-Werten
3. Eine ausreichende Wasserlöslichkeit,
4. Ein hoher spektraler Überlapp mit dem Absorptionsspektrum der Kupferspezies,
5. Ein möglichst inerte Farbstoff, der nicht in das Komplexbildungsgleichgewicht eingreift, hohe Fluoreszenzlebensdauern und eine hohe Photostabilität besitzt.
6. Ein möglichst einfacher synthetischer Zugang.

Aufgrund der ersten vier Punkte wurde als möglicher Ligandenkandidat das Tetrapeptid DAHK identifiziert. DAHK entstammt dem N-Terminus des Humanalbumin (HSA)<sup>[236]</sup> und entspricht dem sogenannten ATCUN- (Amino Terminal Copper and Nickel) Motiv, welches kurze Tri- bzw. Tetrapeptide nach der Sequenz xxHx beschreibt. Das Peptid DAHK zeigt aufgrund seiner zwei Carbonsäurefunktionen an der Asparaginsäure des N-Terminus und am C-Terminus eine gute Wasserlöslichkeit. Seine konditionelle Dissoziationskonstante beträgt  $^cK_D = 26 \pm 4$  fM ( $(\log K_D = -13.59 \pm 0.15)$ ). Sie ist damit extrem niedrig und wurde in verschiedenen Studien bestimmt.<sup>[237]</sup> Die Betrachtung der Kristallstruktur und der NMR-Daten zeigt, dass sich ein quadratisch-planarer Kupferkomplex bildet, an dessen Bindung der N-Terminus, die Amidbindungen zwischen DA und AH sowie einem Stickstoff des Imidazol-Heterozyklus des Histidins beteiligt sind (s. nachfolgende Abbildung).<sup>[238]</sup>



**Abbildung 2-34** Röntgenkristallstruktur des DAHK-Cu-Komplexes nach Hureau *et al.*<sup>[238]</sup>

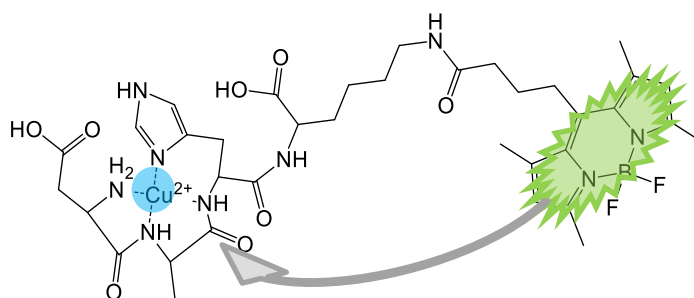
Aufgrund des Jahn-Teller-Effekts des Kupfer(II)-Kations, der räumlichen Vorkonfiguration des Peptids und des makrozyklischen Effekts bildet das Peptid mit Kupfer wesentlich stabilere Komplexe als mit anderen zweiwertigen Metallen. Die spektroskopischen Eigenschaften lassen sich bereits aus den in Abschnitt 2.2.3.1 beschriebenen Prinzipien und dem dort vorgestellten Inkrementsystem abschätzen. Konkret für den vorliegenden Fall von DAHK bedeutet dies:

$$\begin{aligned}
 \lambda_{max} \pm \Delta\lambda &= \frac{1000}{\sum_{i=1}^4 i\tilde{\nu}} \pm 10 \text{ nm} \\
 &= \frac{1000}{0.450 + 2 \cdot 0.495 + 0.427} \pm 10 \text{ nm} \quad (2.48) \\
 &= 536 \pm 10 \text{ nm}
 \end{aligned}$$

Verglichen mit den in Abschnitt 4.1.3 gezeigten Spektren des DAHK-Cu-Komplexes mit einem Absorptionsmaximum bei 525 nm ist die Vorhersage im Rahmen des Fehlers sehr genau.

Ein weiterer sehr praktischer Aspekt des DAHK ist, dass die freie Aminofunktion des Lysins nicht an der Komplexbildung teilnimmt. Das heißt, es bietet sich hier ein einfacher synthetischer Zugang an, über simple Amid-Kupplungen einen passenden Farbstoff einzuführen, der räumlich nahe am Metallzentrum ist.

Als besagter Farbstoff wurde ein Tetramethylbodipy-Farbstoff (BODIPY) gewählt. BODIPY-Farbstoffe sind allgemein leicht synthetisch zugänglich, lassen sich einfach modifizieren<sup>[239–241]</sup>, zeigen langen Fluoreszenzlebensdauern<sup>[240,242]</sup>, hohe Photostabilitäten<sup>[243]</sup> und hohe Quantenausbeuten.<sup>[244]</sup> Die Emissionseigenschaften des Bodipy-Farbstoffes passen sehr gut zu den Absorptionseigenschaften des DAHK-Cu-Komplexes, so dass eine hohe FRET-Effizienz und damit eine große Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoff-Peptid-Metall-Komplexes erwartet wird. Nachfolgende Abbildung zeigt die vorgeschlagene Struktur des Komplexes. Aufgrund des FRETs sollte die Fluoreszenzlebensdauer des Komplexes im Vergleich zur *apo*-Form herabgesetzt sein.



**Abbildung 2-35** Vorgeschlagene Struktur des BODIPY-DAHK-Cu-Komplexes und Weg der Energieübertragung durch FRET.

Der Identifikation und dem Einsatz von DAHK als möglicher Sensor-Kandidat vorausgehend standen interne Versuche mit Fluoreszein markiertem  $\beta$ -Amyloid (A $\beta$ 42) und verschiedenen Kupfer(II)-Koordinationskomplexen, welche mit einem BODIPY-Farbstoff markiert waren. Aufgrund der erhaltenen Befunde wurden diese Ansätze allerdings nicht weiterverfolgt. So konnte beobachtet werden, dass die Fluoreszenzlebensdauer der markierten A $\beta$ 42 in Gegenwart von Cu<sup>2+</sup>-Kationen zwar sinkt, die Löslichkeit der Komplexe und auch des Komplexbildners aber ebenfalls sinkt. Grund dafür sind wohl in der Fähigkeit von A $\beta$ 42 Oligomere zu bilden zu suchen.

Ein Tetramethylbodipy-Farbstoff wurde an verschiedene Liganden angebracht. So wurden die in Abbildung 2-36 gezeigten vier potentiellen Sondenmoleküle synthetisiert. Obwohl alle Liganden in Gegenwart von Kupfer(II) eine Abnahme der Fluoreszenzintensitäten und Fluoreszenzlebensdauern zeigten, verfügten sie jedoch teilweise über schlechte Löslichkeiten in wässriger Umgebung, zu geringe Dissoziationskonstanten und waren teilweise nicht selektiv gegenüber Kupfer(II)-Kationen.

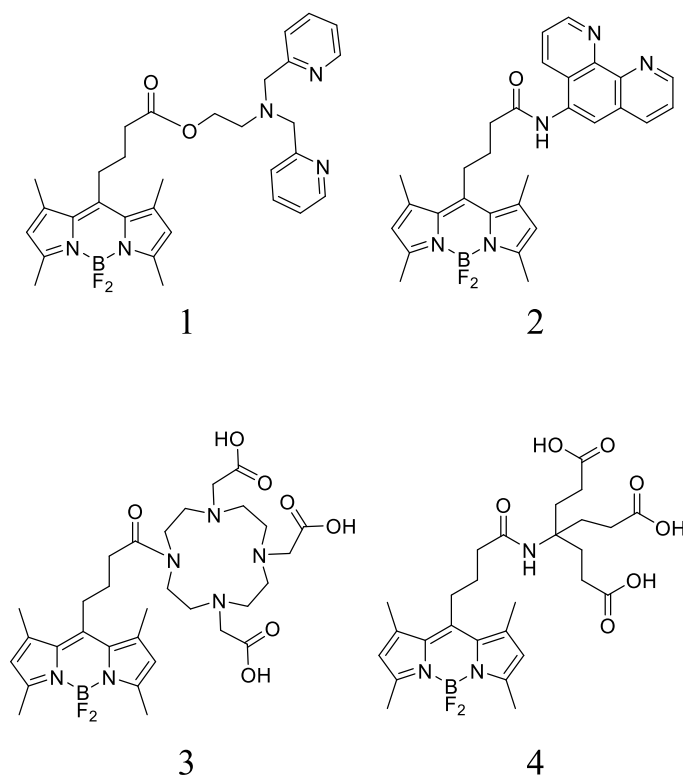


Abbildung 2-36 Vier potentielle Sondenmoleküle für Kupfer(II)-Kationen.

### 3 Material und Methoden

Alle im nachfolgenden verwendeten Chemikalien, Lösemittel und Puffer wurden von Sigma-Aldrich Deutschland GmbH in den höchsten verfügbaren Reinheiten bezogen. Das Fmoc-geschützte Tetrapeptid Fmoc-DAHK wurde von GeneCust Europe kundenspezifisch über Festphasenpeptidsynthese in einer Reinheit >98% synthetisiert. Lösemittel wurden, soweit nicht anders beschrieben, ohne weitere Behandlung verwendet.

Zur Herstellung der 1 mM Metallsalzstammlösungen wurden die entsprechenden leichtlöslichen Metallsalze in HPCE-grade Wasser gelöst.

NMR-Spektren wurden, sofern nicht anders spezifiziert, mit einem 400 MHz Bruker BioSpin Avance 2 NMR-Spektrometer unter Verwendung von Standardpulssequenzen aufgenommen und mit Hilfe der Software MNova (MestReLabs) ausgewertet. Chemische Verschiebungen sind in ppm angegeben und die Spektren auf die Verschiebung des jeweiligen deuterierten Lösemittels<sup>[245]</sup> kalibriert. Sonstige typische Verunreinigungen durch Lösemittel oder Schliff Fett wurden identifiziert<sup>[245,246]</sup> und mit Hilfe der Software aus der Spektren-Analyse ausgeschlossen.

Allgemeine Datenanpassung und Modellierung wurde m. H. von Maple 2017 (Maplesoft) und OriginPro 2016G 64bit (OriginLab Corp.) sowie selbstgeschriebenen Fit-Modellen durchgeführt. Bei speziellen Simulationen wird an dieser Stelle auf das Programm verwiesen.

## 3.1 Spektroskopische Methoden

### 3.1.1 Stationäre Spektroskopie

Absorptionsspektren wurden mit einem Jasco V650 (Jasco Deutschland) Zweistrahlphotonometer zwischen 900-200 nm, einem Abtastintervall von 1 nm und einer Spaltbreite von 5 nm aufgenommen. Fluoreszenzspektren wurden mit Hilfe eines Jasco FP-6500 und einem Abtastintervall von 1 nm aufgenommen. Spaltbreiten wurden von Probe zu Probe angepasst, um ein möglichst gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis zu erhalten.

Quantenausbeuten wurden mit einem Hamamatsu Quantaurus-QY (Hamamatsu Deutschland) aufgenommen. Dieses nutzt eine Ulbricht Kugel, um absolute Quantenausbeuten ohne Referenzmessungen zu ermitteln.<sup>[247]</sup>

### 3.1.2 Zeitaufgelöste Spektroskopie

Alle zeitaufgelösten Experimente wurden entweder auf selbstentworfenen und zusammengestellten Aufbauten oder kommerziell erhältlichen Systemen durchgeführt. Diese werden unten näher beschrieben. Steuerung und Analyse der Experimente wurden durch die SymphoTime 64 Software (PicoQuant GmbH, Deutschland) übernommen.

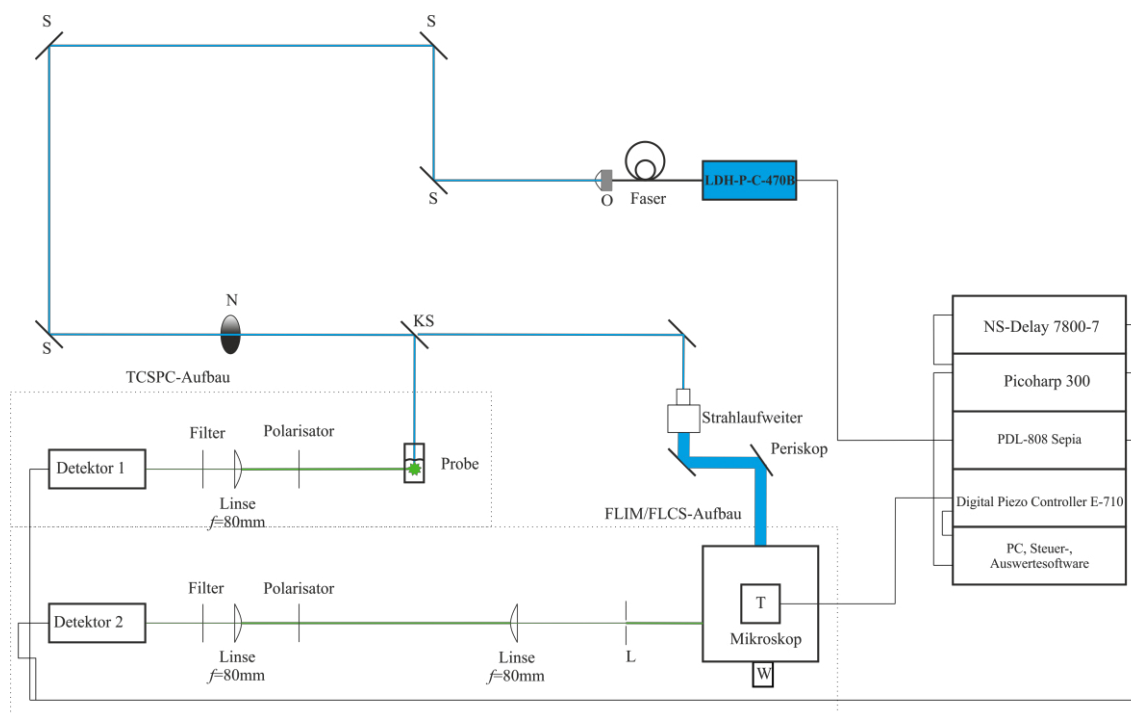
Mit dem verwendeten Aufbau können mehrere unterschiedliche Experimente realisiert werden. Allgemein können sowohl Fluoreszenzlebensdauern in einem TCSPC-Experiment aufgenommen werden als auch mit Hilfe des inversen Mikroskops FLIM und FLCS-Messungen durchgeführt werden. Durch Einbringen geeigneter Polarisationsfilter können auch leicht zeitaufgelöste Anisotropien gemessen werden.

Probenanregung kann mit gepulsten Lasern unterschiedlicher Wellenlängen, Pulsbreite und Repetitionsfrequenz erfolgen. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Anregung immer mit Hilfe eines 470 nm gepulsten Halbleiterdiodenlasers der Firma PicoQuant GmbH (LDH-P-C-470B) bei 20 MHz Repetitionsrate getrieben und synchronisiert von einem PDL-808 Sepia (PicoQuant GmbH) Lasertreiber. Der Laser wird über eine polarisationserhaltende TEM<sub>00</sub>-Single-Mode Faser und einen justierbaren Kollimator (CFC-5X-A, ThorLabs GmbH) in den Aufbau eingebracht. Der Strahldurchmesser hinter dem Kollimator beträgt ca. 2.2 mm. Nach der Umlenkung durch mehrere Spiegel durchtritt

der Strahl ein Neutraldichtefilter zur Anpassung der Laserintensität. Gerade bei den gepulsten Halbleiterlasern der LDH-Serie ist es wichtig, dass der Laser nahe der Laserschwelle betrieben wird und, wenn möglich, die Intensität des Lasers nur über Neutraldichtefilter eingestellt wird. Jede Änderung der Intensität am Lasertreiber hat zur Folge, dass sich die Pulsbreite, Pulsform und damit die Form IRF verändert. Dies kann zu Fehlern im Rekonvolutionsalgorithmus beim Auswerten führen.

Nach dem ND-Filter wird der Laserstrahl durch einen kinematischen Spiegel (KS) entweder in das TCSPC-Experiment oder in das FLCS/FLIM-Experiment geleitet.

Im TCSCP-Experiment wird der Strahl mit Hilfe einer plankovexen Linse ( $f = 80 \text{ mm}$ ) in die Probe geleitet. Die dort entstehende Fluoreszenz wird von einer Linse kollimiert ( $f = 80 \text{ mm}$ ), passiert einen Bandpassfilter (AHF Analysentechnik) und einen Polarisationsfilter (Jasco GmbH Deutschland), welcher auf die Magic Angle Bedingungen von  $54.7^\circ$  eingestellt ist. Anschließend wird das gefilterte Emissionslicht auf eine SPAD (MPD-Series, Micro Photon Devices S.r.l) fokussiert und dort detektiert.



**Abbildung 3-1** Schematischer Aufbau der Experimente.

Befindet sich der kinematische Spiegel(KS) nicht im Strahlengang, wird der Laserstrahl durch einen 3x Strahlaufweiter (ThorLabs GmbH) geführt und tritt über ein Periskop in



das inverse Mikroskop (M, Axiovert 200, Zeiss) ein. Die Strahlaufweitung des Lasers ist notwendig, um das fast vollständige ausfüllen der rückwärtigen Objektivapertur zu gewährleisten. Dadurch kann ein fast Gauß'sches Anregungsvolumen erzeugt werden (s. Abschnitt 2.4.1.4 und Hess *et al.*<sup>[198]</sup>).

Der aufgeweitete Strahl wird über einen dichroitischen Spiegel (z405/470rpc XT, AHF Analysentechnik) in die rückwärtige Apertur des Objektivs (C-Apochromat 63x/1.2 NA Wasser bzw. C-Apochromat 40x/1.2 NA Wasser, Zeiss) geleitet und in der Probe fokussiert. Zur Probenhalterung werden dicke-korrigierte ( $170 \pm 5 \mu\text{m}$ ) Boro-Silicat Deckgläser (Hecht Assistent) verwendet. Beide Objektive verfügen über einen Korrektionskragen, um eventuelle Deckglasunregelmäßigkeiten auszugleichen. Für die Abrasterung der Probe zur Erzeugung von FLIM-Bildern steht ein X-Y-Piezo Tisch (PI-733.2CL, Physik Instrumente) zur Verfügung. Dieser wird über einen entsprechenden Treiber (Digital Piezo Controller E-710, Physik Instrumente) angesteuert. Die in der Probe entstandene Fluoreszenz wird vom gleichen Objektiv wieder aufgesammelt (*epi*-Fluoreszenzmikroskopie) und passiert den dichroitischen Spiegel. Eine Tubuslinse ( $f = 164,7 \text{ mm}$ ) fokussiert das Emissionslicht auf ein rundes, in x-, y-, z-Richtung translatorisch justierbares,  $50 \mu\text{m}$  Pinhole (Newport Deutschland), wird von einer plankovexen Linse ( $f = 80 \text{ mm}$ ) kollimiert durch einen geeigneten Bandpassfilter (AHF Analysentechnik) geleitet und von einer weiteren plankonvexen Linse ( $f = 80 \text{ mm}$ ) auf den SPAD-Detektor (SPCM-AQR-14, Perkin Elmer Optoelektronik) fokussiert.

Die Signalweitergabe der Detektoren geschieht über RG 223 Koaxialkabel im Falle des MPD-SPADs und über ein BNC-Kabel im Falle des SPCM-SPADs. Die Signale werden von der TCSPC-Zähleinheit (PicoHarp 300, PicoQuant GmbH) registriert und nach einem FIFO(First In First Out)-Prozess aufgezeichnet. Bei letzterem Detektor ist darauf zu achten, dass zwischen Detektor und TCSPC-Modul ein Inverter-Attenuator-Modul (SIA400, PicoQuant GmbH) eingebaut ist. Dieser dient dazu, die TTL Pulse des SPCM-SPAD-Detektors in von der PicoHarp 300 verwertbare NIM-Pulse umzuwandeln.

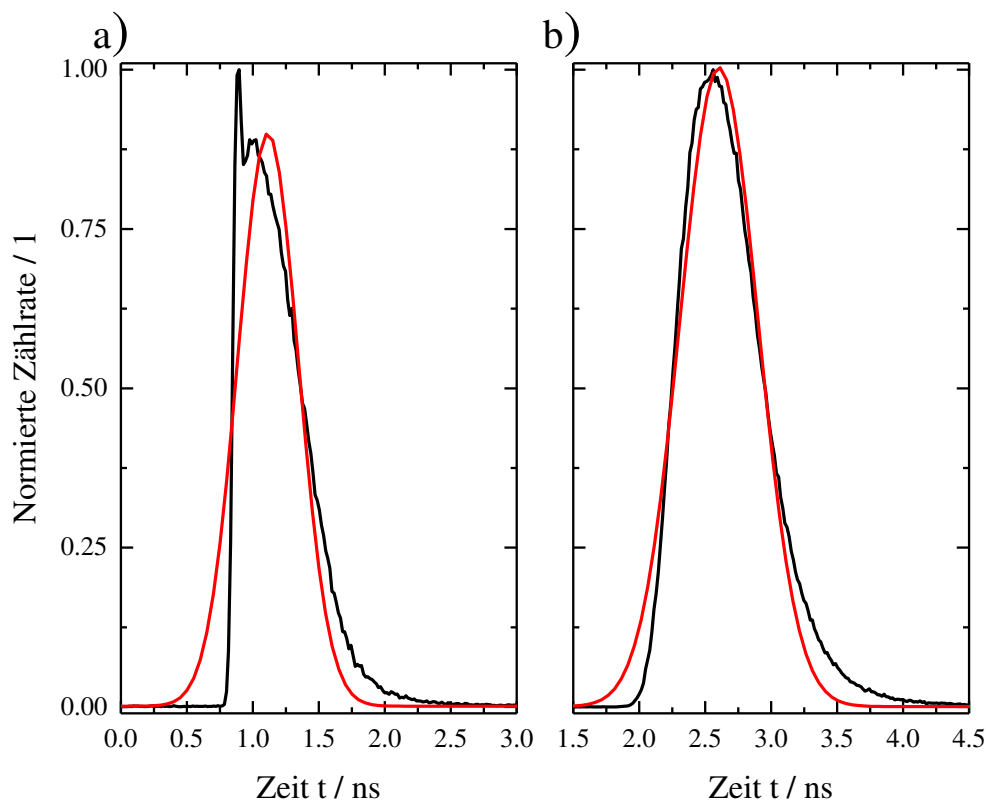
Zur Synchronisation der Anregungspulse mit den TCSPC-Zeitkanälen wird eine elektronische Delayline (PSD-MOD, Micro Photon Device S.r.l.) verwendet. Die Experimente

und Geräte werden von der SymphoTime 64 Software kontrolliert. Die PicoHarp 300 operiert bei jedem Experiment im t3-Modus, um die Ankunftszeiten einzelner Photonen sowie die globalen Zeiten der Photonen zu registrieren.

Einige der FLCS Messungen wurden zudem auf einem Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop der Firma Olympus (Olympus IX83 CLSM) durchgeführt. Der prinzipielle Aufbau entspricht dem oben beschriebenen, die Proben wurden hier jedoch mit einem gepulsten Laser bei 485 nm (LDH-D-C-485, PicoQuant GmbH) angeregt, sowie die Daten mit einer TimeHarp 260 (PicoQuant GmbH) aufgenommen.

### 3.1.2.1 Charakterisierung der IRF

Die Instrumente Antwortfunktion – IRF wurde für die beiden verwendeten Detektortypen mit Hilfe der in Abschnitt 2.3.2 beschriebenen Iodid-Methode durchgeführt. Die Anregung fand bei 470 nm, einer Repetitionsrate von 20 MHz und einer durchschnittlichen Laserleistung von  $P = 40 \mu\text{W}$  statt. Im Detektionsstrahlengang stand ein 525/50 nm Bandpassfilter zur Abtrennung des Fluoreszenzsignals vom Lasersignal. Die erhaltenen IRF sind in Abbildung 3-2 dargestellt. Zur Bestimmung der zeitlichen Breite der IRF wurden diese mit einer Gaußfunktion angepasst und die FWHM bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-1 wiedergegeben.



**Abbildung 3-2** Ermittelte IRF (schwarz) sowie Anpassung durch eine Gaußfunktion (rot) für die beiden Detektoren a) MPF-Series b) SPCM-AQR-14

**Tabelle 3-1** Zeitliche Breite der gemessenen IRF

Detektor	IRF FWHM /ps
SPCM-AQR-14	695
MPD-Series	540

### 3.1.2.2 Charakterisierung des Anregungs- und Detektionsvolumens

Das von einem optimal justierten Set-Up erzeugte Anregungsvolumen ist als Intensitätsverlauf in Abbildung 3-4 gezeigt. Die Simulationen wurden mit Hilfe des frei verfügbaren Programmes PSFLab von Nasse und Wöhl durchgeführt.<sup>[248]</sup> Das Programm nutzt zur Berechnung des Intensitätsverlaufs im Probenvolumen die experimentellen Parameter des Aufbaus. Diese sind in Tabelle 3-2 wiedergegeben.

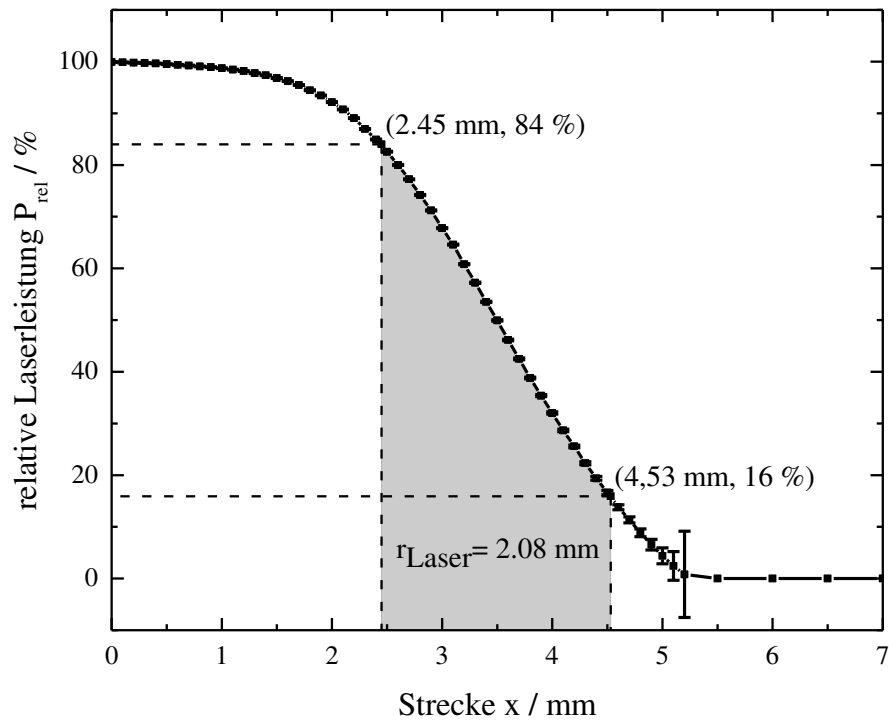
**Tabelle 3-2** Experimentelle Parameter zur Simulation des Anregungsvolumens

Parameter	Wert
Laserwellenlänge $\lambda$ / nm	470
Numerische Apertur NA	1.2
Dicke Deckglas $d$ / $\mu\text{m}$	170 $\pm$ 5
Brechungsindex Probe $n_{\text{probe}}$ / 1	1.33
Brechungsindex Immersionsflüssigkeit $n_{\text{Im}}$ / 1	1.33
Brechungsindex Deckglas $n_{\text{Dg}}$ / 1	1.52
$\beta$	1.68

Wie bereits in Abschnitt 2.4.1.4 erklärt, handelt es sich bei dem Faktor  $\beta$  um die sogenannte *underfilling fraction*. Sie wird berechnet aus dem Verhältnis von Laserstrahlradius zu dem Radius der rückwärtigen Apertur des verwendeten Objektivs.

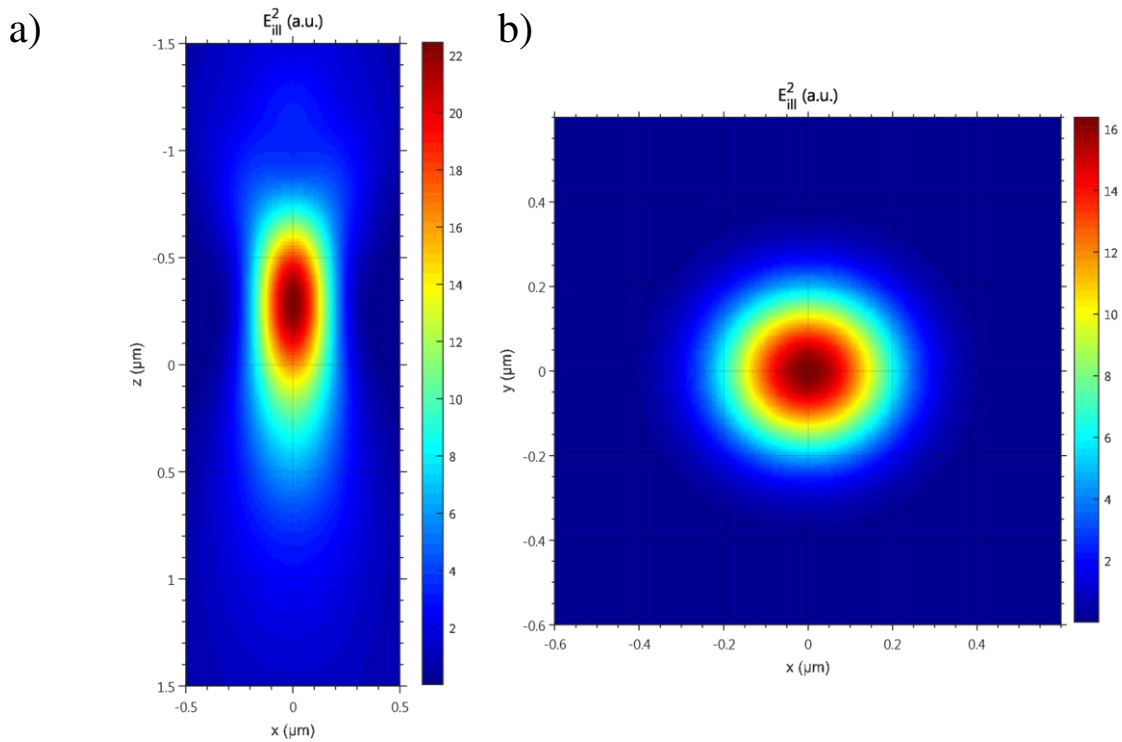
$$\beta = \frac{r_{\text{Objektiv}}}{r_{\text{Laser}}} \quad (3.1)$$

Zur Berechnung von  $\beta$  wurde der Strahldurchmesser vor Eintritt in das Objekt mit Hilfe einer beweglichen Schneide ausgemessen.<sup>[249]</sup> Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-3 dargestellt.



**Abbildung 3-3** Bestimmung des Laserstrahldurchmessers mit Hilfe einer beweglichen Schneide.

Mit dem Radius der rückwärtigen Apertur  $r_{\text{Objektiv}} = 3.5 \text{ mm}$  ergibt sich  $\beta = 1.68$ .

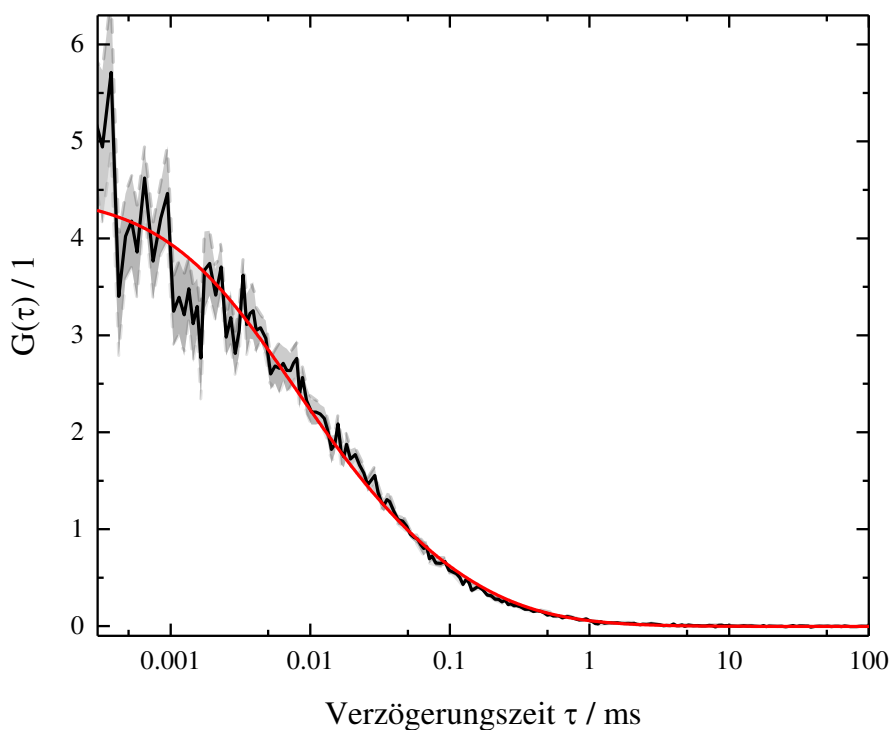


**Abbildung 3-4** Simulation des Anregungsvolumens erzeugt von einem Laser mit einer Wellenlänge  $\lambda = 470 \text{ nm}$ , fokussiert durch ein Zeiss C-Apochromat 63x/1.2 NA Wasserimmersionsobjektiv. Teil a) zeigt das Laserintensitätsprofil in axialer Ausdehnung entlang der z-Achse, b) zeigt das Intensitätsprofil in der x,y-Ebene. Für die Berechnung wurde ein  $\beta = 1.68$  angenommen. Die Simulationen wurden mit dem frei verfügbaren Programm PSFLab, entwickelt von Nasse und Wöhl, durchgeführt.<sup>[248]</sup>

Interessant ist der Vergleich der Anregungsprofile aus Abbildung 3-4 und Abbildung 2-23. Wie bereits in Abschnitt 2.4.1.2 handelt es sich bei der Beschreibung des Intensitätsverlaufs durch eine Gaußfunktion bzw. Lorentzfunktion nur um eine Näherung. In obiger Abbildung ist eine deutlich stärkere Ausdehnung in axialer-Richtung zu erkennen. An dieser Stelle soll noch einmal auf die Arbeit von Hess und Webb verwiesen werden, die ausführlich das abweichende Verhalten zu der Näherung behandelt und unter welchen experimentellen Bedingungen diese gilt.<sup>[198]</sup> Die Ausdehnung und Größe des simulierten Anregungsvolumens beträgt in x-Richtung  $0.304 \mu\text{m}$ , in y-Richtung  $0.341 \mu\text{m}$  und in z-Richtung  $0.849 \mu\text{m}$ . Daraus ergibt sich ein Anregungsvolumen von  $V_{\text{sim}} = 0.369 \mu\text{m}^3 = 0.369 \text{ fL}$ .

Um nun das reale effektive Detektionsvolumen  $V_{\text{eff}}$  des Set-Ups zu messen, wurde das Experiment folgendermaßen kalibriert:

Eine ca. 1 nM Rhodamin 110 Lösung bei  $pH = 7.4$  wurde auf ein Deckglas aufgebracht und mit 470 nm, einer Repetitionsrate von  $f = 20$  MHz und einer durchschnittlichen Leistung von  $P = 40 \mu\text{W}$  zur Fluoreszenz angeregt. Das abgestrahlte Fluoreszenzlicht wurde mit Hilfe des 525/50 nm Bandpassfilters vom Anregungslicht spektral getrennt und auf den Detektor geleitet. Die Kalibrierung erfolgte in abgewandelter Form zu dem von Kim *et al.* beschriebenen Protokoll.<sup>[197]</sup> In einem ersten Kalibrierschritt wurde durch Einstellungen der Stellschrauben an Lochblende, Linsen und Detektor das Fluoreszenzsignal bzw. die Zählrate pro Molekül (cpm) maximiert. In einem zweiten Schritt wurden hingegen der Anregungsstrahlengang optimiert, so dass sowohl die cpm maximiert als auch die in der online-Autokorrelationsanalyse angezeigte Diffusionszeit der ACF minimiert wurde. Beide Schritte wurden solange wiederholt bis keine Änderung der cpm nach oben und keine Änderung der Diffusionszeit nach unten erreicht werden konnte. Die Größe und Form des effektiven Detektionsvolumens  $V_{\text{eff}}$  wurde mit Hilfe der Diffusionskonstante von Rhodamin 110<sup>[250]</sup>  $D = 470 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  und der Gleichungen (2.32)-(2.36) bestimmt (s. Abbildung 3-5).<sup>[251]</sup> Die Kalibrierung des Experimentes wurde an jedem Mess-tag wiederholt und vor sowie nach jeder Messreihe verifiziert.



**Abbildung 3-5** Kalibrier-ACF einer ca. 1 nM Rhodamin 110 Lösung (schwarz) sowie die Anpassungskurve (rot).

Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 3-3 wieder.

**Tabelle 3-3** Abmessungen des effektiven Detektionsvolumen  $V_{\text{eff}}$ .

Parameter	Wert
$\omega_0 / \mu\text{m}$	0.218
$\omega_z / \mu\text{m}$	0.976
$\kappa$	4.468
$V_{\text{eff}} / \text{fL}$	0.259

Verglichen mit den theoretisch ermittelten Werte aus der Simulation unterscheiden sich Anregungs- und Detektionsvolumen nur geringfügig; das verwendete Set-Up ist also nahe an seinem theoretischen Optimum. Das Detektionsvolumen ist kleiner als das theoretische Anregungsvolumen, da bei ersterem noch der Einfluss der Lochblende, die das gesamte Anregungsvolumen verkleinert, eine große Rolle spielt.



## 4 Experimentelles

### 4.1 Synthese und Charakterisierung des Sensors

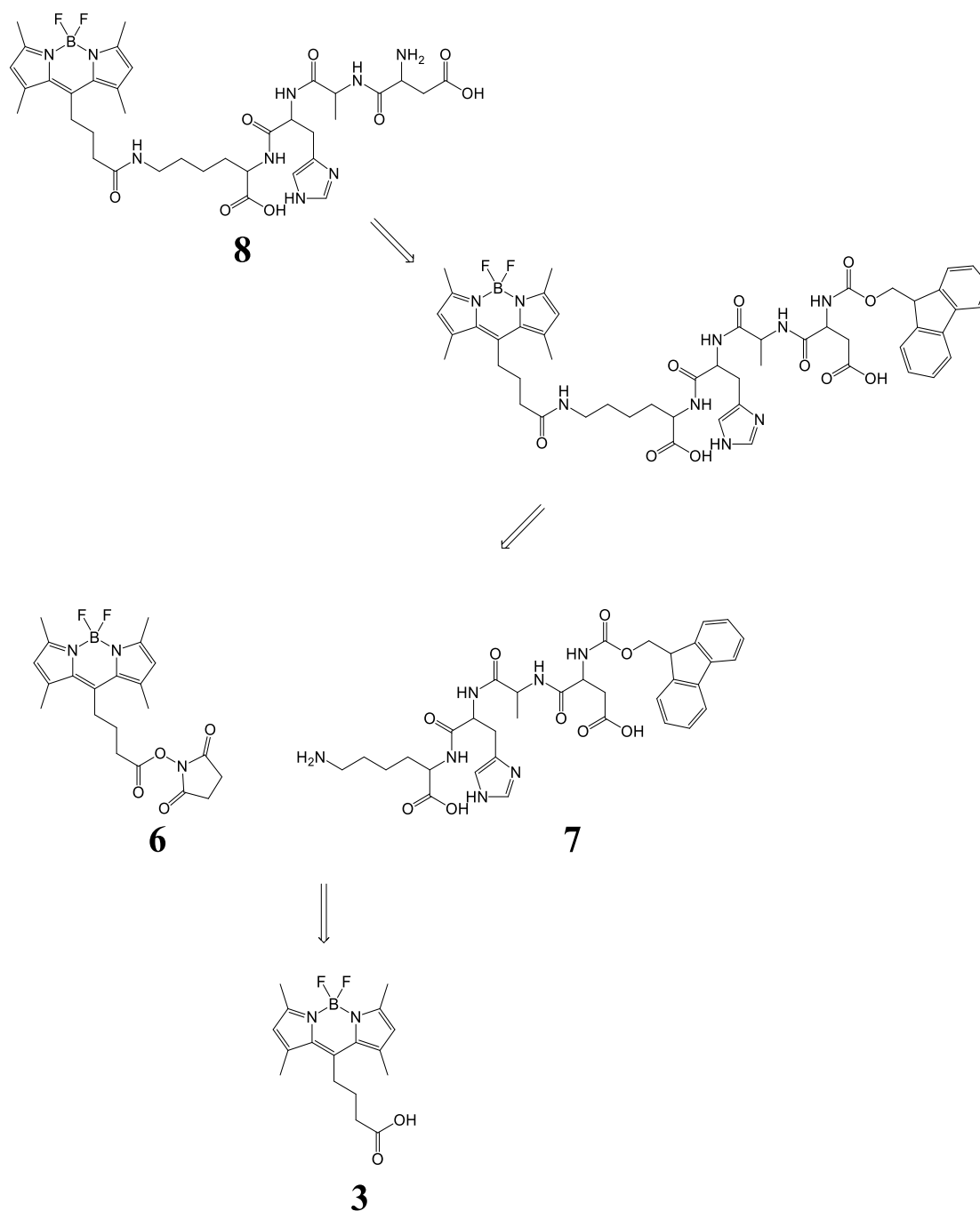


Abbildung 4-1 Vorgeschlagenen Syntheseroute des Zielmoleküls DAHK-BDPY.

Ausgehend von der oben vorgeschlagenen Struktur wurde ein Bodipy-Aktivester zur Kopplung an das N-Terminal Fmoc-geschütztes DAHK-Peptid gewählt. Als am einfachsten synthetisch zugänglich und für die weiteren Reaktionen am idealsten hat sich ein NHS-Ester als Aktivester erwiesen. Versuche mit Pentafluorphenolestern ergaben in der Aufreinigung des Bodipy-Aktivesters schlechtere Ausbeuten und zeigten sich nicht sehr reaktionsfreudig bei der Kopplung mit dem Peptid.

Das verwendete Peptid muss unbedingt am N-Terminus eine Schutzgruppe besitzen. Nur dadurch kann gewährleistet werden, dass die Kopplung des Farbstoffes selektiv am primären Amin der Lysinseitenkette angreift. Aus mehreren Gründen wurde eine Fmoc-Schutzgruppe gewählt. Zum einen ist diese sehr leicht und schnell zu entschützen; sie ist zudem stabil gegenüber tertiären Aminen<sup>[252]</sup>, wodurch sich die Kopplung des Farbstoffes in Gegenwart von DIPEA realisieren lässt, ohne dass die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten wird. Zum anderen ist es die Standardschutzgruppe, die sich ohnehin durch die Festphasenpeptidsynthese bedingt am N-Terminus des Peptids befindet, was wiederum weitere Syntheseschritte erspart.

## 4.1.1 Synthese

### 4.1.1.1 4-(4,4-Difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a,-diazas-indacene-8-yl)-buttersäure

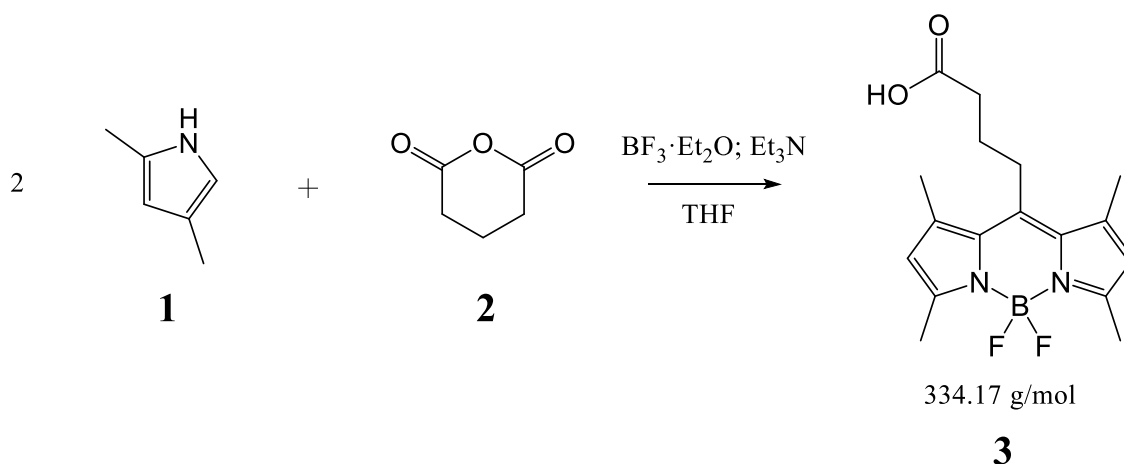


Abbildung 4-2 Synthese des Bodipy-Farbstoffes.

Der Tetramethylbodipy-Farbstoff **3** ist literaturbekannt und wurde gemäß dieser Vorschrift<sup>[239]</sup> synthetisiert. Die genaue Synthesevorschrift und Identifikation des Moleküls ist in Anhang A1.1 bzw. A.2.1 dargestellt.

### 4.1.1.2 4-(4,4-Difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a,-diazas-indacene-8-yl)-buttersäure-N-hydroxysuccinimid Ester

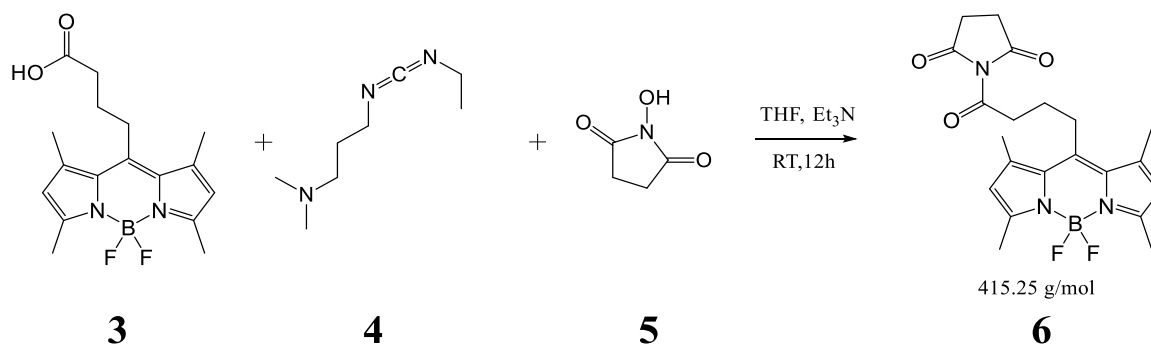
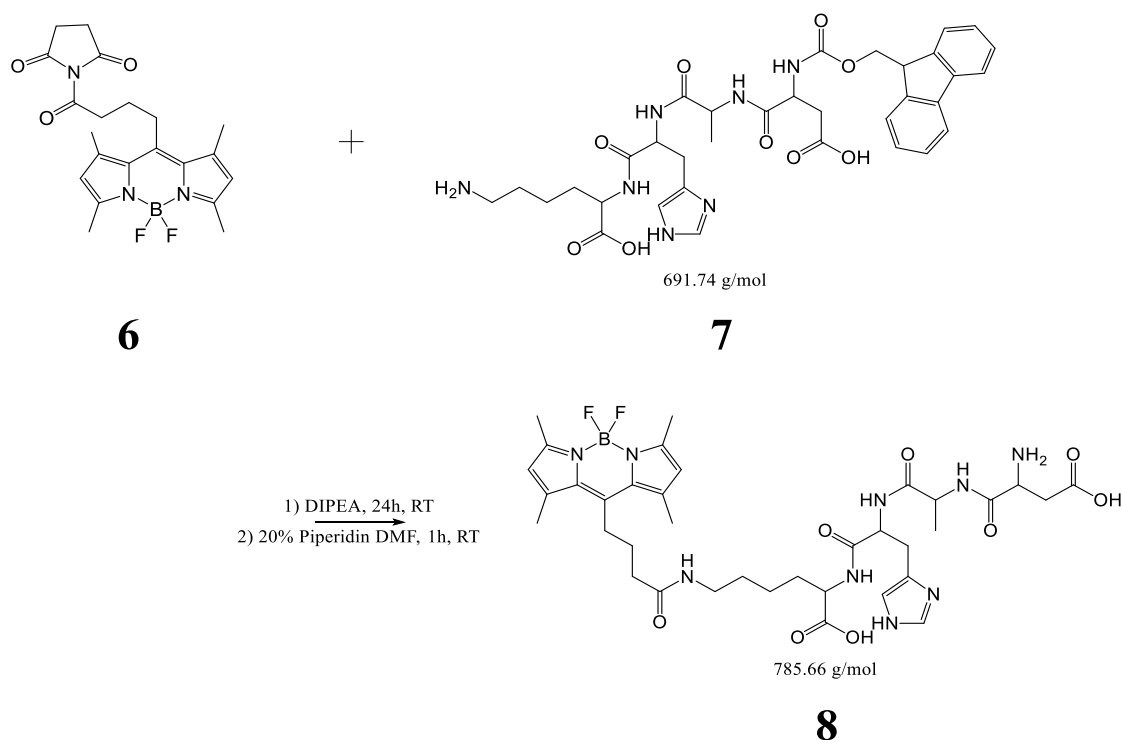


Abbildung 4-3 Synthese des Bodipy-Aktivesters.

Die Synthese des Bodipy-NHS-Esters **6** ist ebenfalls literaturbekannt und beschrieben.<sup>[253]</sup> Die genaue Synthesevorschrift und Identifikation des Moleküls ist in Anhang A1.2 bzw. A.2.2 dargestellt.

#### 4.1.1.3 DAHK-BDPY - N2-aspartylalanylhistidyl-N6-(4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4l4,5l4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)butanoyl)lysine



**Abbildung 4-4** Synthese des Zielmoleküls DAHK-BDPY.

Das Bodipy-NHS-Ester Edukt **6** (62.3 mg, 144  $\mu$ mol) wird zusammen mit dem N-Terminal Fmoc-geschützten Tetrapeptid DAHK (**7**, 66.6 mg, 96  $\mu$ mol) in 2 mL THF gelöst. Zu der orangefarbenen Lösung werden 65  $\mu$ L DIPEA (49.4 mg, 382  $\mu$ mol) gegeben und die Lösung 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 h wird das Lösemittel im Hochvakuum entfernt und der Rückstand in 2 mL einer 20 % Piperidin Lösung in DMF aufgenommen und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wird erneut im Hochvakuum entfernt und der Rückstand mit Hilfe einer präparativen HPLC aufgereinigt. Es werden 7 mg (8.9  $\mu$ mol, 9.3 % Ausbeute) des Bodipy gelabelten DAHK

**8** (im weiteren DAHK-BDPY) erhalten. Die genaue Prozedur der Aufreinigung und Charakterisierung des DAHK-BDPY ist Abschnitt 4.1.2 beschrieben.

### 4.1.2 Aufreinigung und Strukturaufklärung

Das Endprodukt DAHK-BDPY bedurfte einer aufwendigeren Reinigung und aufgrund der strukturellen Komplexität sowie der geringen Ausbeute einer umfassenderen und sensitiveren Strukturaufklärung als mit herkömmlichen MS und NMR Methoden.

#### 4.1.2.1 Präparative HPLC

Die Aufreinigung des Endproduktes wurde in zwei Schritten auf einem Waters (Waters GmbH, Deutschland) präparativen HPLC Autopurifier System (APS) mit zwei verschiedenen Säulen durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das Gerät mit einer analytischen Phenomenex (Phenomenex Ltd., Deutschland) Biphenyl 250x4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$   $d_p$  Säule zur Methodenentwicklung bei 1.0 mL/min Flussgeschwindigkeit ausgestattet. Die präparative Trennung erfolgte auf einer Phenomenex Biphenyl 250x22 mm, 5  $\mu\text{m}$   $d_p$  Säule bei 25 mL/min Flussgeschwindigkeit. Beide Säulen verwendeten ein Laufmittel aus (A)  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.1 % FA und (B) ACN + 0.1 % FA. Die Trennung erfolgte durch Injektion einer 800  $\mu\text{L}$  Probe und startet mit einer 1 min anhaltenden isokratischen Trennung bei 25 % B, gefolgt von einem linearen Gradienten auf 29 % B über 22 min und einem steilen Anstieg auf 95 % B innerhalb 1 min, um auf einem 4 min Plateau zu enden, bevor zu den Ausgangskonzentrationen zur Reequilibration zurückgekehrt wurde. Das Fraktionensammeln wurde durch einen Massentrigger bei 786.4 bzw. 383.7 m/z (mit  $z=1$  bzw.  $z=2$ ) ausgelöst. Die gesammelten Fraktionen wurden lyophilisiert und der Rückstand in wenig DMSO zur weiteren Aufreinigung aufgenommen. Für den zweiten präparativen Schritt wurden die Biphenyl-Säulen durch zwei Phenomenex Gemini C18 Säulen der gleichen Ausmaße ausgetauscht. Das Eluentensystem und die Flussraten wurden nicht verändert. Die Trennung erfolgte zunächst für 2 min isokratisch bei 19 % B bevor die Konzentration von B über einen Zeitraum von 20 min auf 27 % linear erhöht wurde. Nach dem ersten Gradienten wurde die Konzentration von B innerhalb von 1 min auf 95 % erhöht und bei dieser Konzentration für 2 min gehalten, bevor die Säule bei den Ausgangsbedingungen reequilibriert wurde. Das reine Endprodukt wurde automatisch durch den oben genannten Massentrigger gesammelt und das Lösemittel entfernt.

#### 4.1.2.2 NMR-Spektren

NMR-Spektren wurden auf einem Bruker Ascend 700 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen. Selbiges war mit einem 5 mm TXI Kryokopf zur Empfindlichkeitssteigerung ausgestattet. Aufgenommen wurden  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY und TOCSY Spektren unter den Standard Pulsbedingungen in DMSO- $d_6$ .

Mit Hilfe der oben genannten Spektren konnte die vorgeschlagene Struktur bestätigt werden. Eine genaue Auflistung der chemischen Verschiebungen und der zugehörigen Kerne sind im Anhang A 1.3 dargestellt.

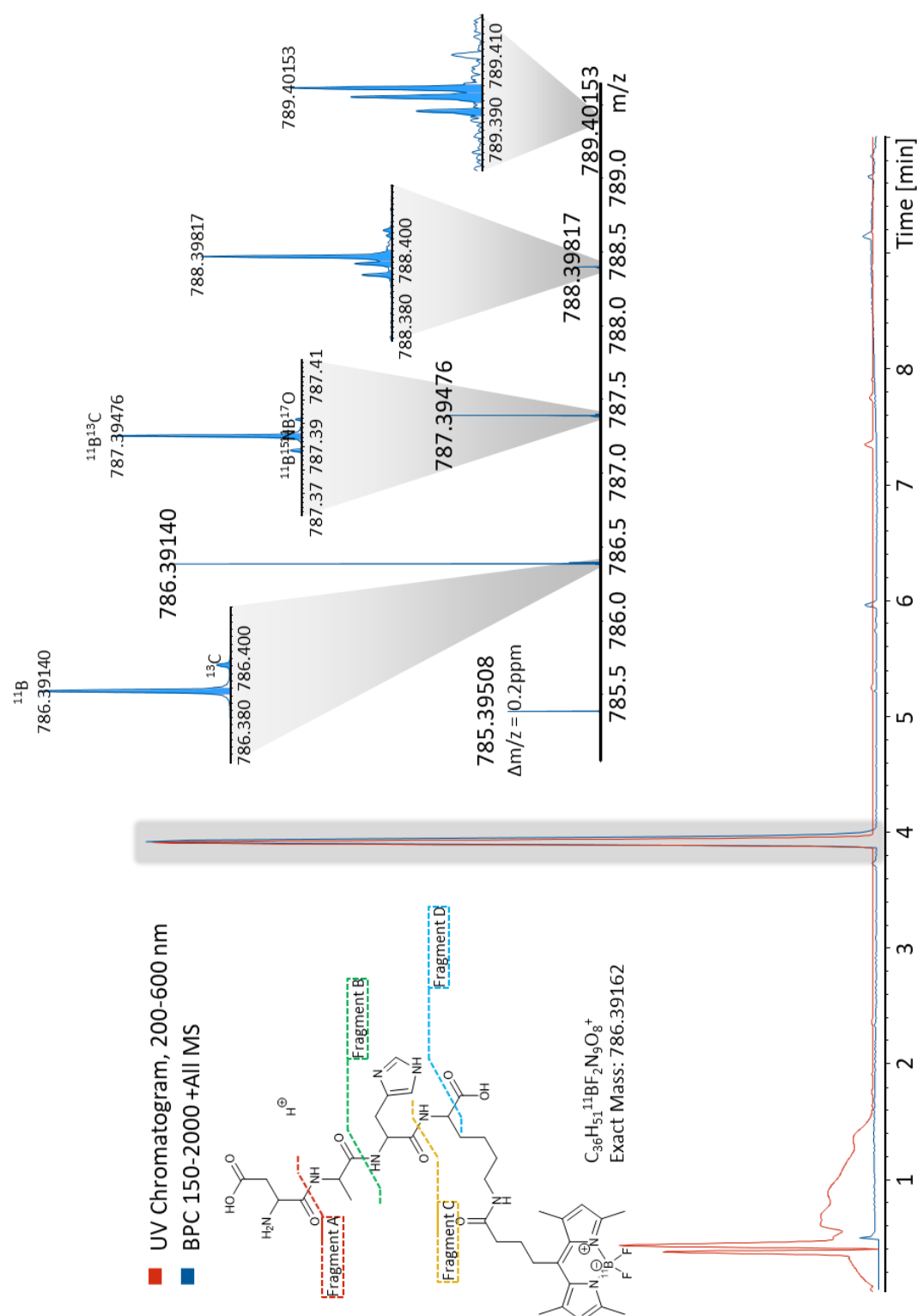
Die Auswertung der chemischen Verschiebungen und Kern-Korrelationen erfolgt softwaregestützt und bestätigt die vorhergesagte Struktur des DAHK-BDPY Moleküls.

#### 4.1.2.3 Hochauflösende Massenspektrometrie

Alle LC-MS Messungen wurden auf einem Dionex Ultimate 3000 RSLC System, ausgestattet mit einer Waters BEH C18, 50x2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$   $d_p$  Säule, durchgeführt. Trennung einer 1  $\mu\text{L}$  Probe wurde durch einen linearen Gradienten mit dem oben bereits beschriebenen Eluenten bei einer Flussrate von 600  $\mu\text{L}/\text{min}$  und 45°C durchgeführt. Anfangs wurde das Laufmittel 1 min isokratisch bei 5 % B gehalten, bevor innerhalb von 9 min der Eluent auf 95 % B erhöht wurde. Vor der Reequilibrierung bei den Ausgangsbedingungen wurde die Konzentration 1.5 min bei 95 % B gehalten. UV-Spektren wurden von einem DAD zwischen 200 und 600 nm aufgenommen. Die Flussrate wurde auf 75  $\mu\text{L}/\text{min}$  reduziert, bevor die Probe über eine Apollo ESI Quelle in das solariX XR (7T) FT-ICR Massenspektrometer (Bruker Daltonics GmbH, Deutschland) eingeleitet wurde. Die ESI Quelle operierte bei 200°C und 4500 V bei einem Trocken-Gas Fluss von 4.0 L/min und einem Vernebler-Druck von 1.1 bar. Nachdem die dort erzeugten Ionen den Quadrupol mit einem low-cutoff bei 150 m/z passierten, wurden sie in der Kollisionszelle für 100 ms gefangen und anschließend innerhalb 1.0 ms durch den Hexapol in die ICR Zelle transferiert. Gefangene Ionen wurden durch einen Frequenzsweep von 100 bis 1600 m/z angeregt und im Breitband Modus durch einen 489 ms Transienten detektiert.

Nach der Aufreinigung der Probe zeigt das Chromatogramm (s. Abbildung 4-5) einen einzelnen Peak, der im UV-Spektrum bei ca. 480 nm detektiert wird. Hier liegt das Absorptionsmaximum des verwendeten BODIPY-Farbstoffes.

Neben der Hauptmasse des gewünschten Produktes bei  $m/z = 786.39140$  für das Molekül mit einem  $^{11}\text{B}$ -Isotop lassen sich, durch die extrem hohe Auflösung des Spektrometers nicht nur das typische Bor-Isotopenmuster, sondern auch noch weitere Isotopenmuster wie z.B.  $^{11}\text{B}^{13}\text{C}$  oder auch Stickstoff und Sauerstoff Isotopen erkennen. Alle experimentell bestimmten Massen stimmen sehr gut mit den vorhergesagten und berechneten Massen überein und liefern neben dem NMR, ein weiteres Indiz, dafür, dass es sich bei der synthetisierten Struktur um das gewünschte Produkt DAHK-BDPY handelt.



**Abbildung 4-5** Chromatogramm des aufgereinigten DAHK-BDPY. Die rote Spur gibt die UV-Detektion des DAD zwischen 200-600 nm wieder. Blau zeigt das Chromatogramm registriert durch das Massenspektrometer. Der rechte Einsatz zeigt das hochauflösende Massenspektrum des DAHK-BDPY-Zielmoleküls. Links sind die Struktur sowie die Hauptfragmente des DAHK-BDPY abgebildet.



**Tabelle 4-1** Berechnete und Experimentell gefunden Massen und Zuordnung zu den Fragmenten aus Abbildung A. 11.

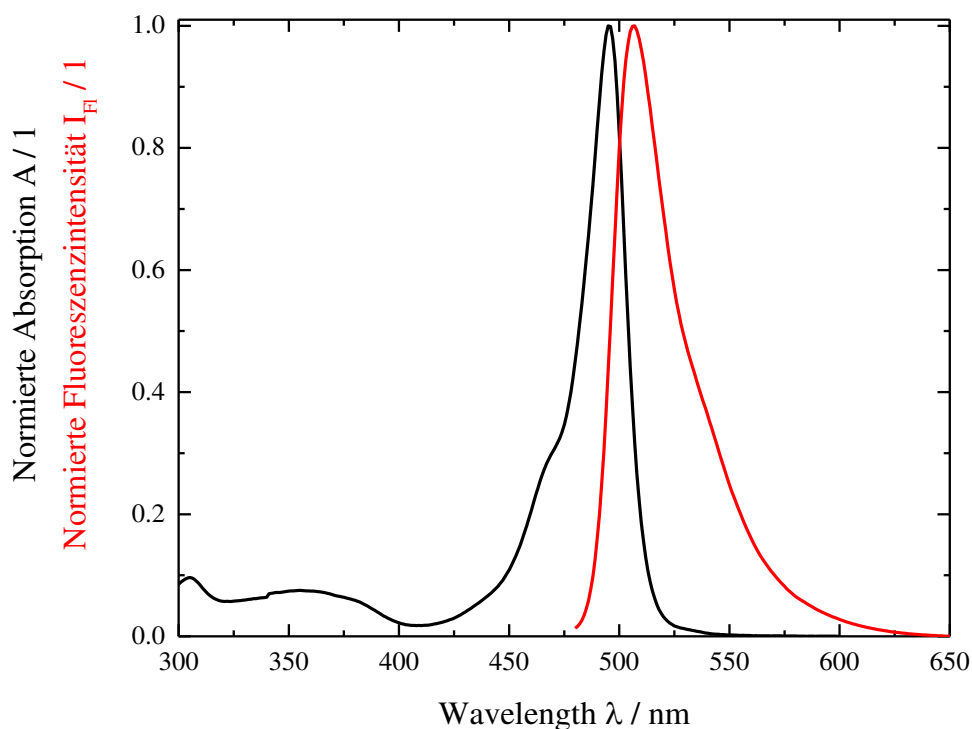
	Calc. m/z <sup>11</sup> B	Calc. Δfrag. m/z	Exp m/z <sup>11</sup> B	Exp. ΔFrag. m/z	Δ m/z / ppm	Fragment Typ
<b>DAHK-BDPY</b>	786.39162		786.39140		0.02	
<b>Δ</b>		20.00623		20.006170		HF
<b>HF-Abspaltung</b>	766.38539		766.38523		0.02	
<b>Δ</b>		115.02694		115.027160		Asparaginsäure
<b>Frag. A</b>	651.35845		651.35807		0.04	
<b>Δ</b>		71.03711		71.037220		Alanin
<b>Frag. B</b>	580.32134		580.32085		0.05	
<b>Δ</b>		137.05891		137.059000		Histidin
<b>Frag. C</b>	443.26243		443.26185		0.06	
<b>Δ</b>		46.00548		46.005480		Ameisensäure
<b>Frag. D</b>	397.25695		397.25637		0.06	
<b>Δ</b>		17.02655		17.026550		Ammoniak
<b>NH3-Abspaltung</b>	380.23040		380.22982		0.06	

Ein weiteres Indiz, dass es sich bei dem betrachteten Produkt um das gewünschte Zielmolekül handelt, ist das Fragmentierungsmuster des Stoffes. Die Ergebnisse und zugehörigen Massen sind in

Tabelle 4-1 wiedergegeben. Die dazugehörigen Strukturen und das Massenspektrum der Fragmentierung sind im Anhang A 2 zu finden. In einer ersten Fragmentierung wird, wie für BODIPYs typisch<sup>[254]</sup>, Flusssäure HF abgespalten. Danach beginnt die Fragmentierung des Peptidrückgrats des Moleküls. Jede Aminosäure wird ihrer Reihe nach vom N-Terminus beginnend abgespalten und so das gesamte Molekül sequenziert. In den zwei letzten Fragmentierungen wird schließlich Ameisensäure und Ammoniak abgespalten. Das Muster der Fragmentierung stimmt mit der vorhergesagten Struktur und den NMR-Experimenten überein. Es kann nun unter Berücksichtigung der UV-Spektren, der NMR-Daten, der hochauflösenden Massen und der Peptidfragmente zweifelsfrei die Aussage getroffen werden, dass es sich bei dem synthetisierten Molekül um das gewünschte Produkt DAHK-BDPY handelt.

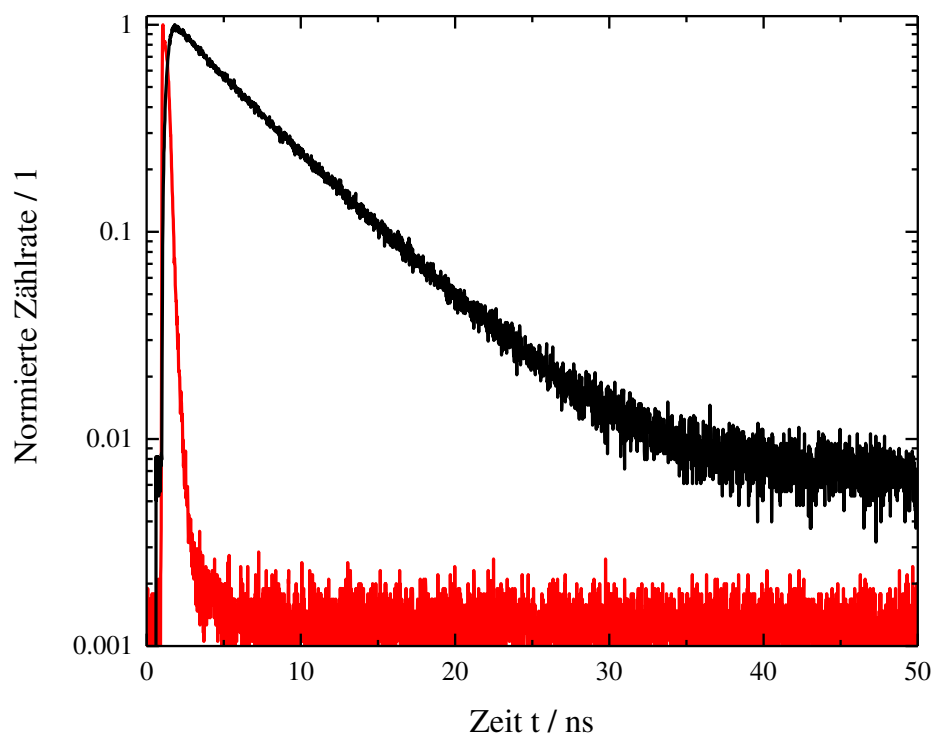
### 4.1.3 Spektroskopische Eigenschaften des DAHK-BDPY

Alle im nachfolgenden behandelten spektroskopischen Eigenschaften wurden, soweit nicht anders spezifiziert, in PBS-Puffer bei  $pH = 7.413$  und einer Ionenstärke von  $I = 154$  mM NaCl aufgenommen.



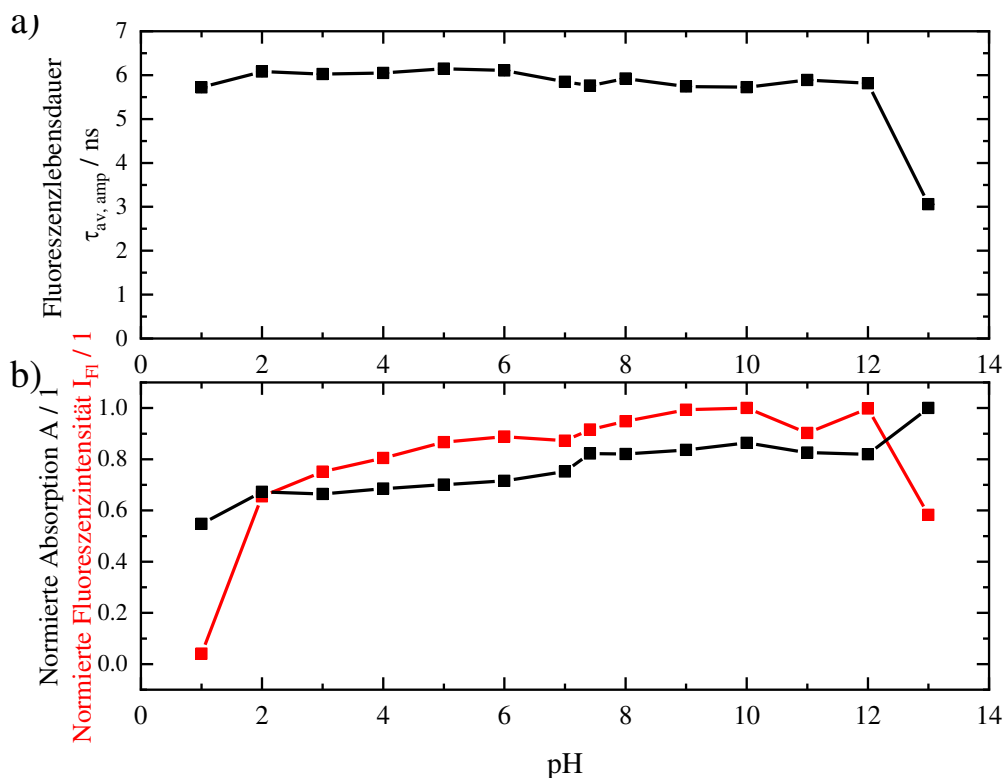
**Abbildung 4-6** Normiertes Absorptionsspektrum (schwarz) und Emissionsspektrum (rot, Anregungswellenlänge  $\lambda_{max} = 470$  nm) des DAHK-BDPY-Sensors Gemessen in PBS-Puffer ( $pH = 7.413$ ,  $I = 154$  mM NaCl)

In Abbildung 4-6 ist das normierte Absorptions- bzw. Emissionsspektrum des DAHK-BDPY-Moleküls gezeigt. Das Hauptmaximum der Absorption liegt bei 495 nm mit einem molekularen Extinktionskoeffizienten von  $\varepsilon_{495\text{ nm}} = 85000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Neben dem Hauptmaximum weist das Absorptionsspektrum ein Nebenmaximum bei 465 nm auf. Unterhalb von 400 nm findet die elektronische Anregung des BODIPY-Farbstoffes in den zweiten angeregten elektronischen Zustand  $S_2$  statt. Noch weiter im blauen verschoben, ab ca. 300 nm, absorbiert die Histidin-Seitenkette des Moleküls. Das Emissionsmaximum des Moleküls liegt bei 507 nm. Daraus resultiert eine für BODIPYs typische Stokes-Verschiebung von 12 nm.



**Abbildung 4-7** Monoexponentieller Zerfall der Fluoreszenz von DAHK-BDPY (schwarz), sowie IRF (rot) in PBS-Puffer ( $pH = 7.413$ ,  $I = 154$  mM NaCl).

Die mit dem Quantaaurus-QY bestimmte Quantenausbeute des Moleküls wurde mit  $\Phi = 75 \pm 2\%$  bestimmt. Die im TCSPC-Experiment aufgezeichnete Zerfallskurve (s. Abbildung 4-7) zeigt eine monoexponentielle Abnahme der Fluoreszenz mit einer Fluoreszenzlebensdauer von  $\tau_{Fl} = 5.76 \pm 0.01$  ns.



**Abbildung 4-8** Verhalten von DAHK-BDPY gegenüber Änderungen des pH-Wertes a) der durchschnittlichen Fluoreszenzlebensdauer b) der normierten Absorption (schwarz,  $\lambda = 495$  nm) bzw. der normierten Fluoreszenzintensität (rot,  $\lambda = 507$  nm).

Der Sensor zeigt eine gute Stabilität in seinen spektroskopischen Eigenschaften gegenüber der Änderung des pH-Wertes (gezeigt in Abbildung 4-8). Die Lebensdauer ändert sich über einen weiten pH-Bereich nur sehr geringfügig, erst ab einem  $pH = 13$  nimmt die Lebensdauer drastisch ab. Dies resultiert in einer Fluoreszenzlebensdauer von  $\tau_{FI} = 3.06 \pm 0.01$  ns. Auffällig ist, dass bei  $pH = 13$  auch die Emissionsintensität abnimmt, aber die Absorption hier ein Maximum aufweist. Das heißt, dass bei hohen Hydroxidionen-Konzentrationen zwar der Extinktionskoeffizient des Moleküls ansteigt, aber auf der anderen Seite ein neuer Relaxationskanal geöffnet wird, der den  $S_1$ -Zustand des Moleküls depopuliert und somit die Quantenausbeute verringert. Dadurch nimmt sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Fluoreszenzlebensdauer ab.

**Tabelle 4-2** Zusammenfassung der Spektroskopische Eigenschaften des DAHK-BDPY Sensors. Gemessen in PBS-Puffer ( $pH = 7.413$ ,  $I = 154$  mM NaCl).

<b>Absorptionsmaximum <math>\lambda_{max}</math> / nm</b>	495
<b>Extinktionskoeffizient <math>\varepsilon_{495\text{ nm}}</math> / L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup></b>	85000±7820 <sup>a)</sup>
<b>Emissionsmaximum <math>I_{Fl,max}</math> / nm</b>	507
<b>Quantenausbeute <math>\Phi</math> / 1</b>	0.75 ± 0.02
<b>Fluoreszenzlebensdauer <math>\tau_{Fl}</math> / ns</b>	5.76 ± 0.19 <sup>a)</sup>

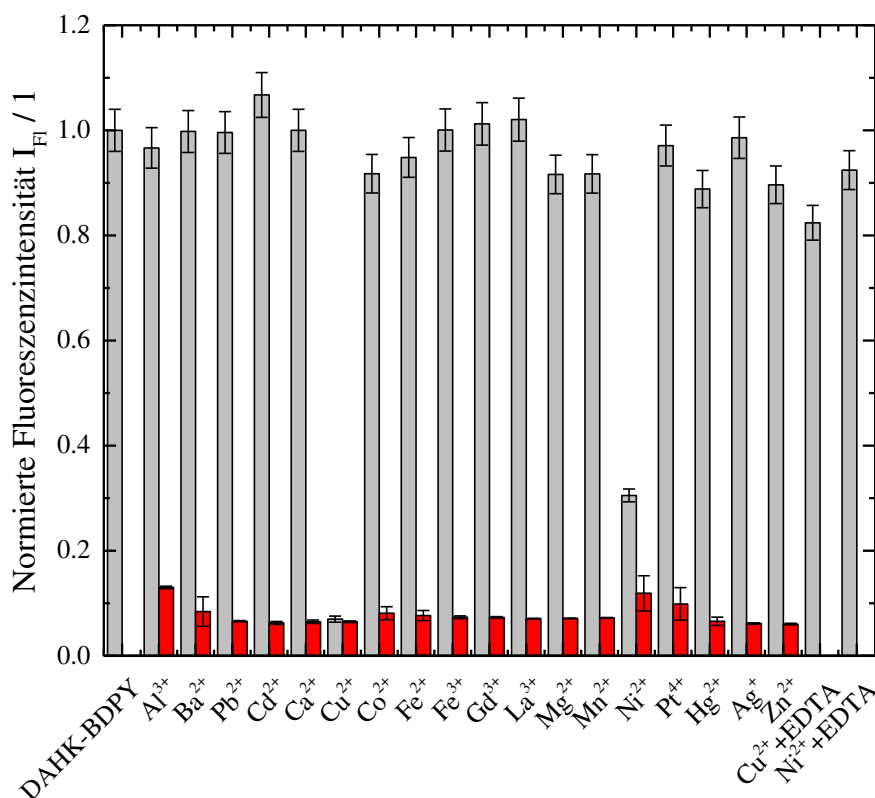
a) hier handelt es sich um die Mittelwerte über alle pH-Werte

Aus der Betrachtung der spektroskopischen Eigenschaften lässt sich schließen, dass diese fast ausschließlich von den Eigenschaften des BODIPY-Farbstoffes geprägt sind und damit sehr gut für die weiteren Experimente geeignet sind.

## 4.2 Das Verhalten des DAHK-BDPY gegenüber Metall-Kationen insbesondere gegenüber $\text{Cu}^{2+}$

### 4.2.1 Das Molekül DAHK-BDPY in Gegenwart von Metallkationen

Das Verhalten der Fluoreszenzemission des DAHK-BDPY gegenüber verschiedener Kationen der Übergangsmetalle wurde in einem Screening-Verfahren überprüft. Dazu wurde der Sensor in 1  $\mu\text{M}$  Konzentration in PBS-Puffer ( $pH = 7.413$ ,  $I = 154 \text{ mM NaCl}$ ) vorgelegt, bei 470 nm zur Fluoreszenz angeregt und die Emissionsintensität bei 507 nm aufgezeichnet.



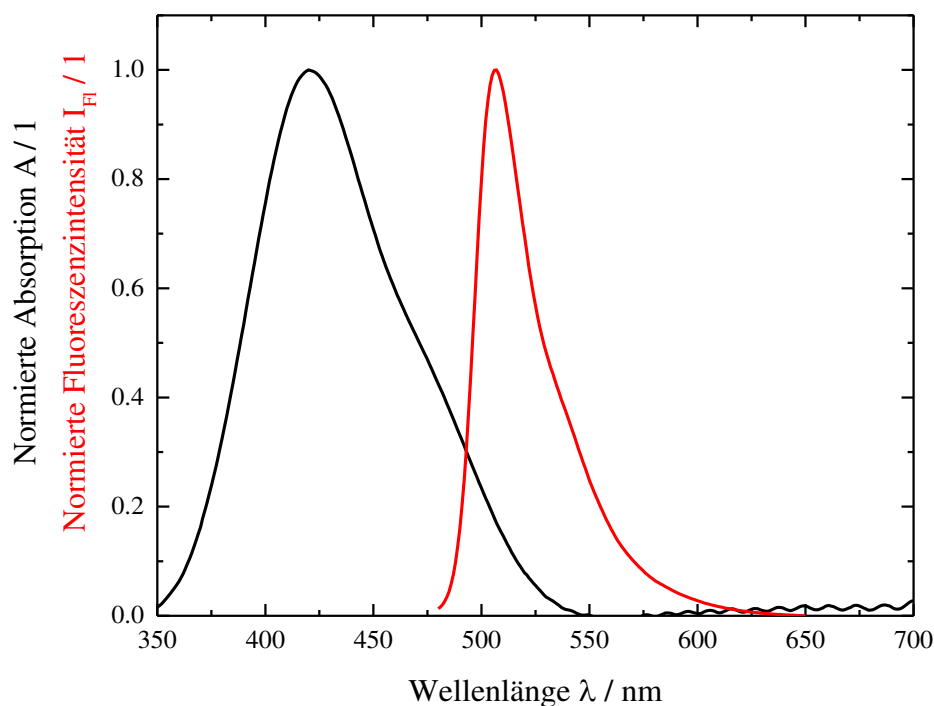
**Abbildung 4-9** Verhalten des DAHK-BDPY gegenüber verschiedener Kationen der Übergangsmetalle. Grau: DAHK-BDPY 1 eq und 10 eq des  $\text{M}^{x+}$ -Kations in PBS-Puffer  $pH = 7.413$ . Rot: DAHK-BDPY 1 eq und 10 eq des  $\text{M}^{x+}$ -Kations in PBS-Puffer  $pH = 7.413$  sowie zusätzlich 1 eq  $\text{Cu}^{2+}$ .

In einem ersten Experiment wurden die in Abbildung 4-9 genannten Metallkationen in zehnfachem Überschuss zu dem DAHK-BDPY Sensor gegeben und 2 h bei Raumtemperatur gerührt, um dem System Zeit zu geben das Gleichgewicht zu erreichen.

Im Rahmen der Messgenauigkeit, ist eine signifikante Fluoreszenzabnahme nur in Gegenwart von Nickel(II) bzw. Kupfer(II)-Kationen zu erkennen. Bei Anwesenheit von  $\text{Cu}^{2+}$ -Kationen reduziert sich die Fluoreszenzintensität um  $93 \pm 5\%$ . Dies geschieht sogar, wenn andere Metallkationen in zehnfachem Überschuss in der Lösung vorhanden sind (Abbildung 4-9 rote Balken). Wird den Nickel- und Kupfer-Lösungen EDTA in zehnfachem Überschuss ( $100 \mu\text{M}$ ) zugegeben, so steigt die Fluoreszenz wieder bis auf  $82 \pm 4\%$  (im Falle des Kupfers) bzw.  $92 \pm 4\%$  (im Falle des Nickels), des ursprünglichen Wertes an. Grund für die nichtvollständige Wiederherstellung der Fluoreszenzintensität sind in der sehr hohen Affinitäten des DAHK-Rückgrats gegenüber Kupfer bzw. Nickel zu suchen.

Zur Überprüfung der Selektivität des Sensors für Kupfer gegenüber anderen Metallkationen wurden den zuvor vermessenen Lösungen je 1 eq  $\text{Cu}^{2+}$ -Kationen zugegeben und die Konzentration der anderen Kationen auf  $100 \mu\text{M}$  erhöht. Wie obiger Abbildung zu entnehmen, fällt nun in jeder Probelösung die Fluoreszenz drastisch um teilweise mehr als 90 % ab. Daraus lässt sich folgen, dass der Sensor eine hohe Selektivität gegenüber Kupfer zeigt.

Die Tatsache, dass auch in Gegenwart von Nickel die Fluoreszenz sinkt, ist nicht weiter verwunderlich. Die Basis des Sensors ist das schon in Kapitel 2.5 beschriebene ATCUN-Motiv. Der DAHK-BDPY bindet also auch an Nickel in einem oktaedrischen Komplex und spaltet die d-Orbitale des Metallatoms soweit auf, dass es in der Lage ist, die Fluoreszenz des BODIPY-Farbstoffes durch FRET zu löschen. In nachfolgender Abbildung ist das Emissionsspektrum sowie das Absorptionsspektrum des DAHK- $\text{Ni}^{2+}$ -Komplexes gezeigt. Auch hier ist eine Überlappung der beiden Spektren zu erkennen.



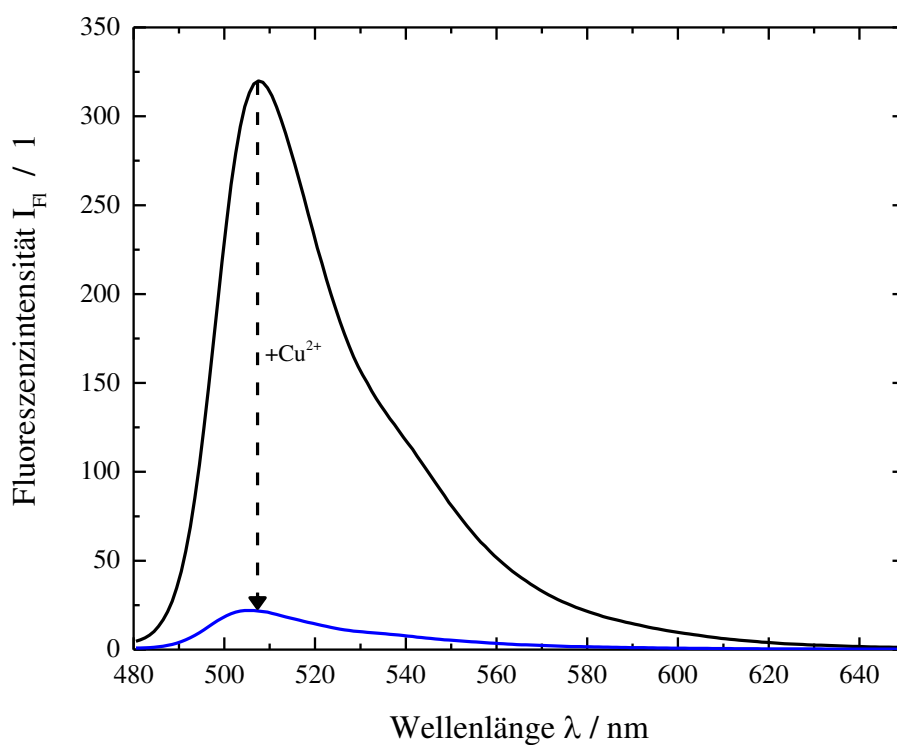
**Abbildung 4-10** Absorptionsspektrum des DAHK-Ni<sup>2+</sup>-Komplexes (schwarz) sowie Emissionsspektrum von DAHK-BDPY (rot).

Die Tatsache, dass auch Nickel gebunden wird und eventuell bei der Quantifizierung der Kupfer(II)-Ionen stören könnte, ist allerdings nicht gegeben. Wie in Kapitel 2.5 schon erwähnt, bildet das Tetrapeptid DAHK den N-Terminus des HSA. Dort bildet es die Bindungsstelle für Kupfer- und Nickel-Kationen und zeigt gegenüber Nickel eine Bindungskonstante von etwa 150 nM<sup>[255]</sup> und ist damit etwa 10<sup>5</sup> mal schwächer als die Bindung gegenüber Kupfer. Sokolowska *et. al.*<sup>[256]</sup> führten Untersuchungen zu den Bindungsverhältnissen einer C-Terminal aminierten Version des DAHK durch. Sie bestimmten für die Komplexierung von Kupfer(II) und Nickel(II) die konditionellen Stabilitätskonstanten  ${}^cK$  ( $pH = 7.4$ ,  $I = 0.1$  M KNO<sub>3</sub>) mit  $\log {}^cK_{Cu} = 13.8$  und  $\log {}^cK_{Ni} = 8.7$ . Das bedeutet, dass DAHK-BDPY in Gegenwart von Kupfer und Nickel vor allem nur an Kupfer bindet.



### 4.2.2 Das Verhalten von DAHK-BDPY in Gegenwart von $\text{Cu}^{2+}$ -Kationen

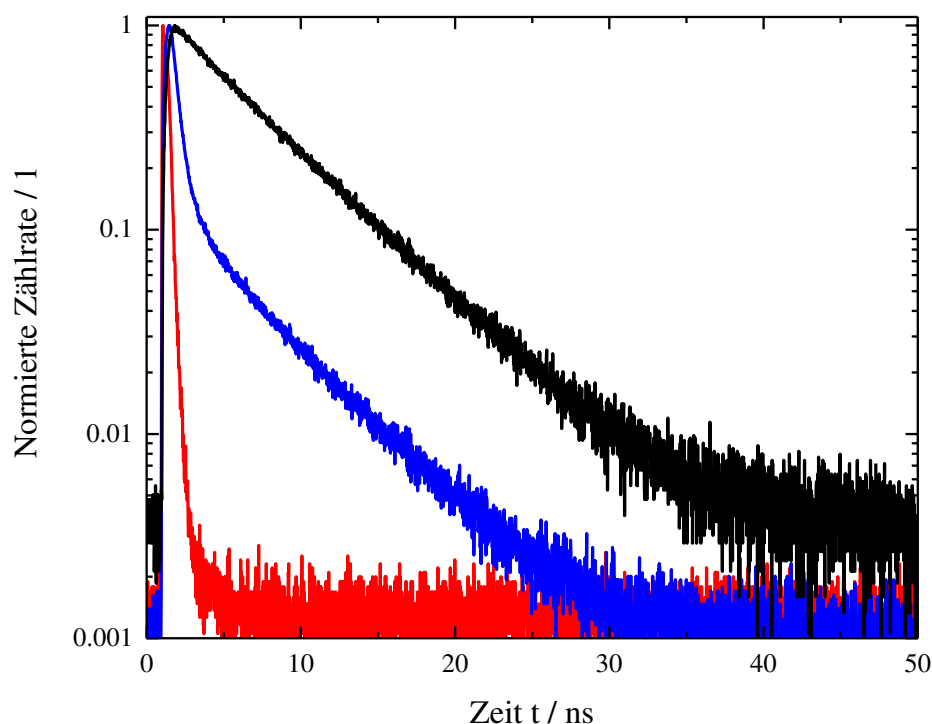
Wie bereits im Screening-Test des vorhergehenden Abschnitts gesehen, nimmt die Fluoreszenz des DAHK-BDPY in Gegenwart von solvatisierten  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen signifikant ab. Im Fluoreszenzemissionsspektrum (s. Abbildung 4-11) ist nach Zugabe von einem Äquivalent Kupfersulfat eine Abnahme um 93 % auf 7 % der ursprünglichen Fluoreszenzintensität zu erkennen. Dies würde einer Verringerung der Quantenausbeute von 75 % auf ca. 5 % gleichkommen. Entsprechende experimentelle Messungen der Quantenausbeuten konnten diesen Wert mit  $3 \pm 4$  % bestätigen. Die großen Schwankungen in dieser Messreihe resultieren aus dem sehr schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis, welches durch die niedrige Konzentration des Farbstoffes und der geringen Quantenausbeute hervorgerufen wird.



**Abbildung 4-11** Emissionsspektrum des Zielmoleküls (schwarz) in Gegenwart von einem Äquivalent  $\text{Cu}^{2+}$  (blau) in PBS-Puffer ( $\text{pH} = 7.413$ ,  $I = 154 \text{ mM NaCl}$ ).

Lebensdauermessungen (s. Abbildung 4-12) zeigen für den DAHK-BDPY in Anwesenheit von einem Äquivalent  $\text{Cu}^{2+}$  einen biexponentiellen Zerfall mit einer amplitudenge-

wichteten mittleren Lebensdauer<sup>2</sup> von  $\tau_{av,amp} = 0.72 \pm 0.01$  ns. Diese setzt sich aus der langen Lebensdauerkomponente des *apo*-DAHK-BDPY mit  $\tau_{Fl} = 5.76 \pm 0.01$  ns ( $A=6.5\%$ ) und der kurzen Lebensdauerkomponente des DAHK-BDPY-Cu-Komplexes mit  $\tau_{Fl,Cu} = 0.41 \pm 0.01$  ns ( $A=93.5\%$ ) zusammen. Die Abnahme in der Lebensdauer entspricht wieder in etwa 93 % und stimmt damit sehr gut mit den vorherigen Beobachtungen überein.



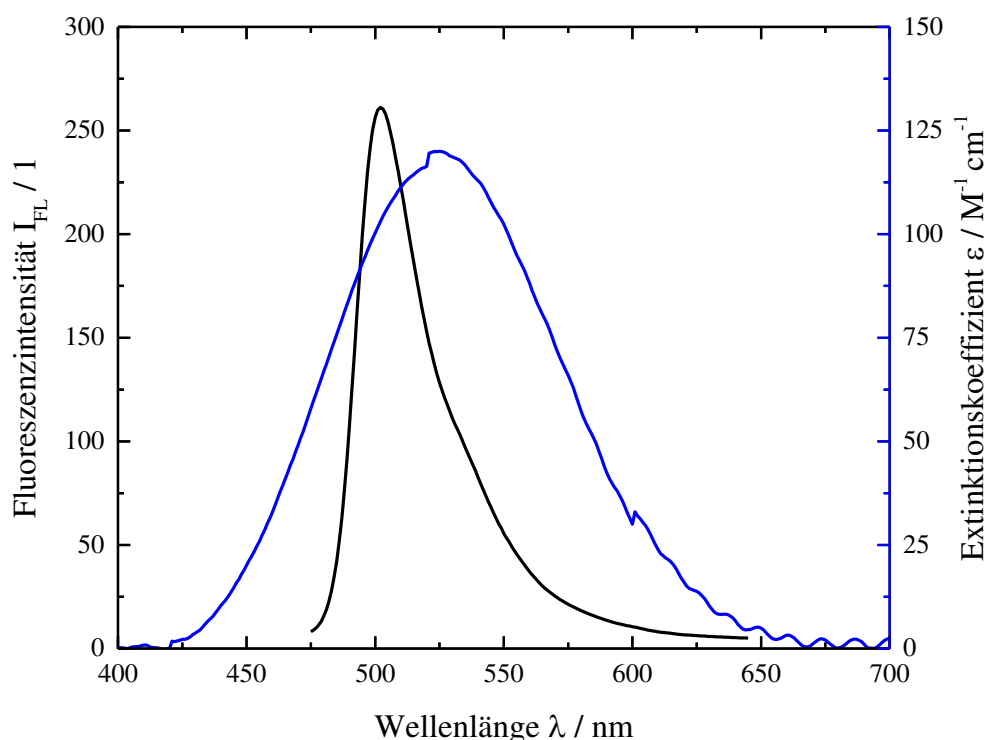
**Abbildung 4-12** TCSPC-Histogramme des DAHK-BDPY (schwarz) in Anwesenheit von einem Equivalent  $\text{Cu}^{2+}$  (blau) sowie der IRF(rot).

Natürlich könnte neben FRET noch klassische dynamische bzw. statische Fluoreszenzlöschung durch Kollisionen stattfinden. Da aber zum einen die größte Intensitätsabnahme bereits bei, für dynamische Fluoreszenzlöschung, moderaten Konzentrationen von einem Equivalent Kupfer(II)-Kationen stattfindet, kann diese Art der Fluoreszenzlöschung ausgeschlossen werden. Zum andern wird die Fluoreszenz nicht komplett gelöscht, was gegen statische Fluoreszenzlöschung spricht. Zusammen mit der Tatsache, dass das Emissionsspektrum des BODIPY-Farbstoffes stark mit dem Absorptionsspektrum des Komplexes

<sup>2</sup> Bei den meisten Experimenten bei denen bi- oder multiexponentielle Zerfälle untersucht werden, ist die Verwendung der amplitudengewichteten mittleren Fluoreszenzlebensdauer zu bevorzugen, da diese direkt proportional zur Fluoreszenzintensität und damit zu der Messgröße aus der stationären Spektroskopie ist. Eine ausführliche Behandlung über die Verwendung der „richtigen“ mittleren Lebenszeiten findet sich bei Sillen *et al.*<sup>[292]</sup>

überlappt, ist ein weiterer Relaxationskanal für den  $S_1$ -Zustand neben FRET eher unwahrscheinlich. In einem späteren Abschnitt dieser Arbeit wird das Lebensdauerverhalten des Sensors bei unterschiedlichen Kupfer(II)-Konzentrationen näher betrachtet; das dort gezeigte konzentrationsabhängige Verhalten der Fluoreszenzlebensdauer ist im Einklang mit FRET als Löschmechanismus.<sup>[120]</sup>

Die eben beschriebene starke Überlappung der Spektren ist unten in Abbildung 4-13 dargestellt.



**Abbildung 4-13** Das Emissionsspektrum des BODIPY-Farbstoffes (schwarz) liegt komplett innerhalb des Absorptionsspektrums (blau) des DAHK-Kupferkomplexes.

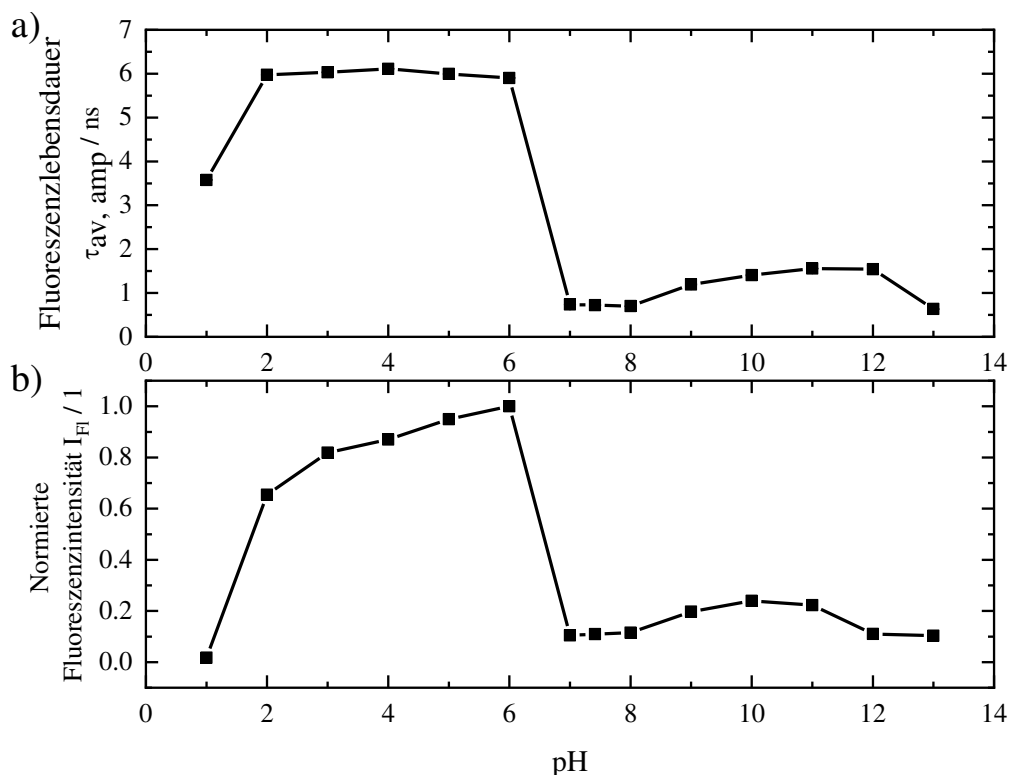
Aus diesem Diagramm lässt sich nach Gleichung (2.10) und (2.12) aus dem Überlappungsintegral der Försterradius mit  $R_0 = 22 \pm 1$  Å bestimmen. Mit Hilfe des Försterradius und der Fluoreszenzlebensdauern lassen sich der Abstand zwischen Donor (BDPY-Farbstoff) und Akzeptor ( $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex) sowie die Effizienz des Energietransfers bestimmen.

**Tabelle 4-3** Zusammenfassung der spektroskopischen Werte des *apo*-DAHK-BDPY und des DAHK-BDPY-Kupfer Komplexes.

	<i>apo</i>	+1 eq Cu <sup>2+</sup>	$\Delta$ / %		<i>apo</i>	+ 1 eq Cu <sup>2+</sup>	$\Delta$ / %
$\lambda_{abs, max} / nm$	495	495/525		$\tau_{FI} / ns$	5.65±0.01	0.41±0.01	93±0.2
$\epsilon_{abs, max} / 10^3 M^{-1} cm^{-1}$	85±7.8	0.12 <sup>[238]</sup> /85±7.8		$R_0 / \text{\AA}$		22±1	
$\lambda_{em, max} / nm$	507	507		$E_{FRET} / \%$		93±0.2	
norm $I_{FI, max} / 1$	100	7	93	$r / \text{\AA}$		14.3±0.6	
$\Phi / \%$	75±2	3±4	96±3				

#### 4.2.2.1 pH-Abhängigkeit des Komplexes

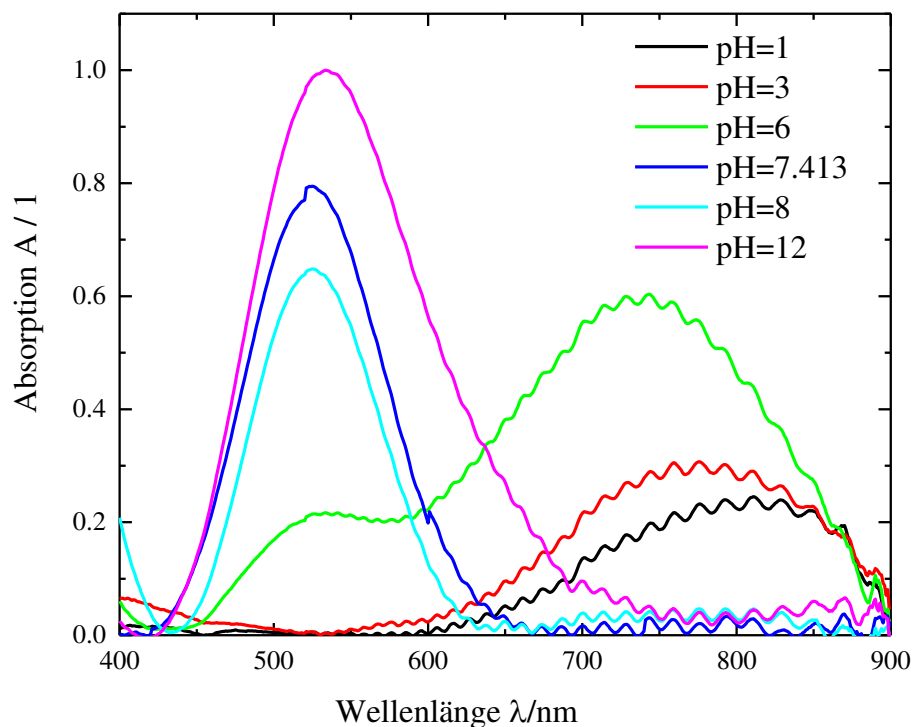
Erst ab einem  $pH > 6$  kommt es zu einem signifikanten Energietransfer zwischen dem Farbstoff und dem Cu<sup>2+</sup>-Komplexes. In Abbildung 4-14 ist die mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{av, amp}$  (a)) bzw. die Emissionsintensität im Maximum  $I_{FI}$  des DAHK-BDPY-Cu<sup>2+</sup>-Komplexes in Abhängigkeit des pH-Wertes dargestellt. Sobald der  $pH > 6$  wird, nimmt  $\tau_{av, amp}$  sowie  $I_{FI}$  schlagartig ab. Grund dafür ist mutmaßlich die Deprotonierung des Imidazol-Rings der Histidin-Seitenkette ( $pK_s = 6.27$ )<sup>[237]</sup>. Sobald die Histidin-Seitenkette nicht mehr protoniert und positiv geladen ist, kann sich der eigentliche Kupfer-Komplex bilden.



**Abbildung 4-14** Verhalten der Fluoreszenzlebensdauer a) und Fluoreszenzintensität b) des DAHK-BDPY- $\text{Cu}^{2+}$  bei verschiedenen  $pH$ -Werten. Alle Messungen wurden bei einer Ionenstärke von  $I = 154\text{mM}$  NaCl bei RT durchgeführt. Zur Sicherstellung, dass keine konkurrierenden Komplexbildungen ablaufen, wurden bei der Messung die sog. Good's Buffer verwendet.<sup>[257,258]</sup>

Natürlich liegen auch schon bei  $pH$ -Werten unterhalb von  $pH = 6$  Kupfer(II)-Komplexe vor; diese sind jedoch bei weitem nicht so stabil, noch zeigen sie eine genügend ausgeprägte Ligandenfeldaufspaltung – und damit einhergehende für FRET geeigneten Absorptionsspektrum – wie der in Abbildung 2-35 abgebildete Komplex.

Anschaulich lässt sich die *hypsochrome* Verschiebung des Spektrums mit steigendem  $pH$ -Wert gut in Abbildung 4-15 beobachten. Ab einem  $pH$  von 6 (grün) bildet sich das Absorptionsmaximum bei 525 nm aus. Dieses Verhalten entspricht dem schon oft beschriebenen spektralen Verhalten von Kupfer-Peptid-Komplexen.<sup>[143]</sup>



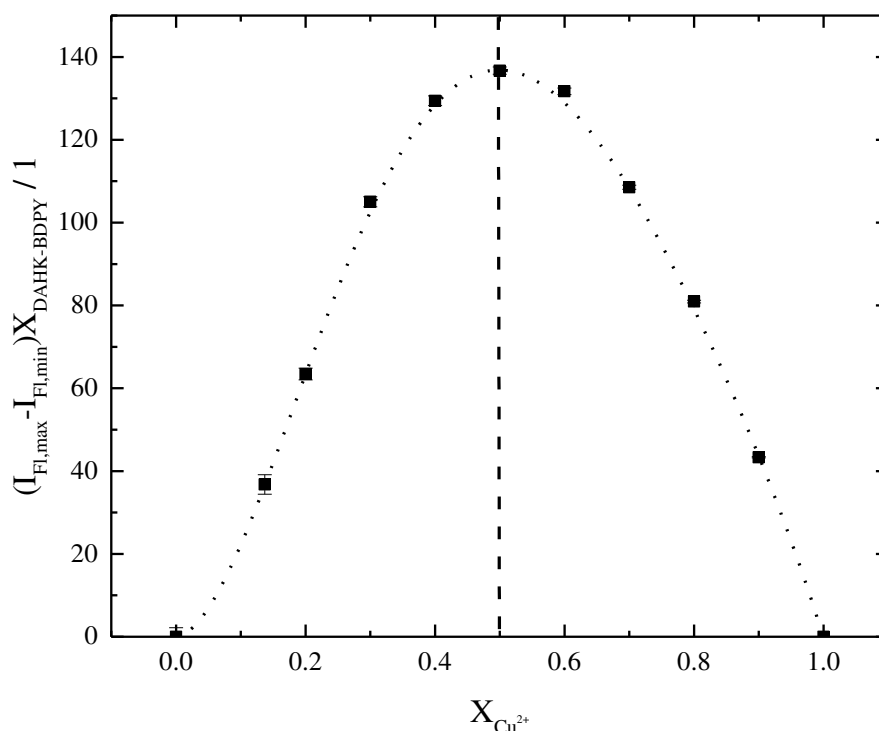
**Abbildung 4-15** Absorptionsspektren des DAHK-Kupfer(II)-Komplexes bei verschiedenen pH-Werten.

Bei sehr hohen  $pH$ -Werten nimmt zwar der Extinktionskoeffizient des Komplexes zu, jedoch ändern sich die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzlebensdauer des Komplexes kaum.

Die starke, durch die Stickstoffliganden induzierte, Aufspaltung der Energieniveaus des 3d-Orbitals des Kupfers resultiert in einem hypsochromen Shift des Spektrums zu einem Absorptionsmaximum von 525 nm. Form und Maximum des Spektrums sowie die räumliche Nähe des BDPY-Farbstoffes zum Kupfer(II)-Kation sind der Grund für den sehr effektiven Energietransfer von 93 %. Der effiziente FRET führt dazu, dass ein neuer Relaxationskanal für den  $S_1$ -Zustand des BDPY-Farbstoffes geöffnet wird, was wiederum führt zu einer sehr starken Reduktion der Fluoreszenzlebensdauer sowie der Emissionsintensität des DAHK-BDPY- $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexes im Gegensatz zu seiner *apo*-Form.

#### 4.2.2.2 Stöchiometrie des Komplexes

Die von Hureau *et al.* bzw. Trapadize *et al.* aufgeklärte Komplexstruktur beschreibt einen DAHK-Cu Komplex mit einer 1:1 Stöchiometrie.<sup>[237,238]</sup> Die spektralen Eigenschaften weisen darauf hin, dass es sich bei dem hergestellten DAHK-BDPY-Cu<sup>2+</sup>-Komplex um eine sehr ähnliche Komplexstruktur handeln muss, da die Absorptionsspektren des Komplex identisch sind. Um zu verifizieren, dass sich die Komplexstruktur durch das Einführen einer zusätzlichen Amid-Bindung nicht verändert oder, dass sich Komplexe mit höherer Stöchiometrie bilden wurde, ein Job-Plot erstellt (s. Abbildung 4-16).



**Abbildung 4-16** Job-Plot des DAHK-BDPY-Cu<sup>2+</sup> Komplexes.

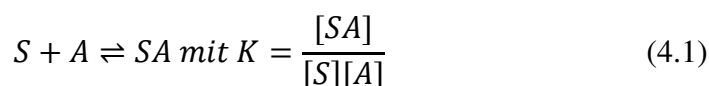
Die Auftragung zeigt ein eindeutiges Maximum bei einem Molenbruch von 0.5, was bedeutet, dass auch hier eine 1:1 Stöchiometrie vorliegt.<sup>[259]</sup>

### 4.2.3 Fluoreszenztitrationen

Titrationen gehören zu den am weitest verbreiteten Techniken der Chemie. Mit ihrer Hilfe lassen sich Konzentrationen<sup>[260,261]</sup>, Gleichgewichtskonstanten<sup>[262,263]</sup> und thermodynamische Parameter<sup>[264–266]</sup> relativ einfach bestimmen.

Zur Illustration des Titrationsprinzips soll im Nachfolgenden nur der einfachste Fall einer bimolekularen Reaktion betrachtet werden. Vor- oder nachgeschaltete Reaktionen können den Komplexitätsgrad der Analyse einer Titration erheblich erschweren. Hier ist eine genaue Betrachtung der jeweiligen Reaktionen unter Berücksichtigung der Massenwirkungsgesetze und der totalen Massenbilanzen notwendig.

Angenommen mit Hilfe eines Sensor  $S$  soll ein Analyt  $A$  bestimmt werden. Beide Spezies reagieren miteinander in einer bimolekularen Reaktion zu einem Komplex  $SA$  mit der Komplexbildungskonstante  $K_A$ .

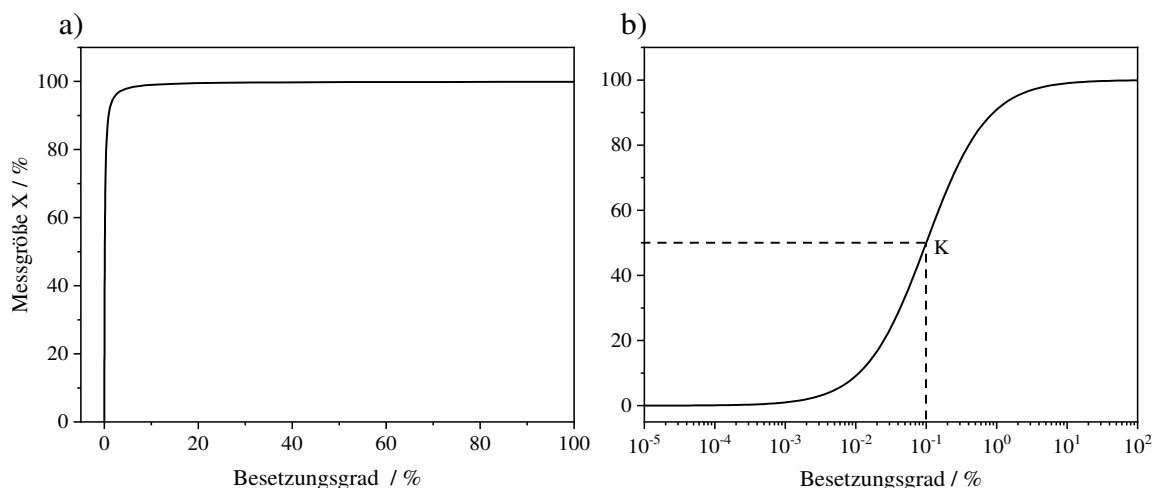


Für den Sensor  $S$  kann nun ein Messwert  $X$  definiert werden, welcher proportional zu der Konzentration an  $S$  ist.

$$X \propto [S] \quad (4.2)$$

Durch Zugabe von  $A$  wird nun der Sensor  $S$  verbraucht und folglich ändert sich die Messgröße  $X$ . Durch Auftragung der Messgröße  $X$  gegen die Analytkonzentration  $A$  ergibt sich der klassische Titrationsverlauf.





**Abbildung 4-17** Verhalten der Messgröße  $X$  gegenüber des steigenden Besetzungsgrades nach Gleichung (4.1). Für diese Reaktion wurde eine Komplexbildungskonstante von  $K_A = 10 \text{ M}^{-1}$  angenommen. In a) ist der Sättigungsverlauf dargestellt, aufgrund der hohen Gleichgewichtskonstante ist ein starker spontaner Anstieg bis zur Sättigung zu erkennen. Einen tieferen Einblick in den Titrationsverlauf bietet eine halblogarithmische Auftragung wie in b) dargestellt. Von Fall zu Fall bieten sich auch linearisierte Auftragungsarten wie z.B. Scatchard<sup>[267]</sup> oder Lineweaver-Burk-Plots<sup>[268]</sup> und viele weitere an.<sup>[269,270]</sup>

Die wohl bekannteste Titrationsart ist die klassische Säure-Base-Titration zur Bestimmung von Konzentrationen und  $pK_s$ -Werten, bei der der  $pH$ -Wert als Messgröße  $X$  benutzt wird. Weitere Titrationsarten basieren beispielsweise auf der Messung von elektrochemischen Potentialen<sup>[271]</sup>, Änderungen in den optischen Eigenschaften<sup>[272,273]</sup>, Änderung der chemischen Verschiebung von NMR-aktiven Kernen<sup>[274]</sup> oder der direkten Messung von Reaktionsenthalpien wie in der Isothermen Titrations Kalorimetrie (ITC).<sup>[266]</sup>

In der vorliegenden Arbeit wird als Messgröße die Fluoreszenzintensität  $I_{Fl}$ , die mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{Fl}$  sowie direkt die Teilchenanzahl  $N$ , zugänglich durch FLCS, der Sensorspezies  $S$  zur Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  und damit zur Bestimmung der Analytkonzentration  $[A]$  angewendet.

#### 4.2.3.1 Betrachtung des Massenwirkungsgesetzes

Die Reaktion des DAHK-BDPY (im Nachfolgenden zur Vereinfachung  $L$  genannt) mit seinem Analyten, den in Lösung befindlichen freien Kupfer(II)-Kationen  $\text{Cu}^{2+}_{\text{aq}}$ , bildet einen Komplex mit einer 1:1-Stöchiometrie (vgl. Abschnitt 4.2.2).



Bei Komplexbildungsreaktionen wird die Gleichgewichtskonstante  $K$  auch als Bindungskonstante  $K_A$  bezeichnet. Ihr Inverses entspricht der Dissoziationskonstante  $K_D$  und damit der Rückreaktion von Gleichung (4.3), also dem Zerfall des gebildeten Komplexes.<sup>3</sup>

$$K = K_A = K_D^{-1} = \frac{[\text{CuL}]}{[\text{Cu}^{2+}_{\text{aq}}][L^{2-}]} \quad (4.4)$$

Bei der Betrachtung von Gleichgewichtsreaktionen ist es wichtig, zwischen den freien und Gesamtkonzentrationen der einzelnen Spezies zu unterscheiden. Als „frei“ werden alle Spezies bezeichnet, die nicht durch andere Moleküle, außer durch das Lösemittel, komplexiert sind. In diesem Fall also  $[\text{Cu}^{2+}_{\text{aq}}]$  und  $[L^{2-}]$ . Mit dieser Unterscheidung ergibt sich für die Massenbilanzen von Kupfer und dem Ligand folgender Zusammenhang.

$$[\text{Cu}^{2+}_{\text{ges}}] = [\text{Cu}^{2+}_{\text{aq}}] + [\text{CuL}] \quad (4.5)$$

$$[L_{\text{ges}}] = [L^{2-}] + [\text{CuL}] \quad (4.6)$$

<sup>3</sup> Streng genommen gilt die nach Gleichung (4.4) definierte Dissoziationskonstante nur in der Gasphase. In wässrigen Systemen spielen noch gekoppelte Protonierungsgleichgewichte eine große Rolle. Zu diesem Zweck wird im Weiteren von konditionellen Dissoziationskonstanten gesprochen, die durch folgende Gleichung definiert sind und die Protonierungsgleichgewichte berücksichtigen:  ${}^cK_D = K_D \left( \sum_i^n 10^{-ipH + \sum_j^i pK_{aj}} \right)$  Mit Hilfe von konditionellen Dissoziationskonstanten können auch leichter die Stabilitäten verschiedener Komplexe eines Metalls verglichen werden, solange sie unter gleichen pH-Bedingungen aufgenommen wurden.

Durch Zuhilfenahme von Gleichung (4.5) bzw. (4.6) kann das Massenwirkungsgesetz aus Gleichung (4.4) umgestellt werden zu untenstehender Gleichung (4.7), um die Abhängigkeit des Systems von der freien Kupfer(II)-Konzentration darzustellen.

$$\theta_b = \frac{[CuL]}{[L_{ges}]} = \frac{[Cu_{aq}^{2+}]}{{}^cK_D + [Cu_{aq}^{2+}]} \quad (4.7)$$

Hier wurde die Größe  $\theta_b$  als Besetzungsgrad eingeführt, diese Größe beschreibt den Anteil der Spezies  $L^{2-}$ , der im Komplex  $CuL$  gebunden ist und hängt mit dem Anteil  $\theta_f$  an freier Spezies  $L^{2-}$  über Gleichung (4.8) zusammen.

$$\theta_b + \theta_f = \frac{[CuL]}{[L_{ges}]} + \frac{[L^{2-}]}{[L_{ges}]} = 1 \quad (4.8)$$

In den meisten Fällen ist die freie Kupfer(II)-Konzentration unbekannt, nicht jedoch die totale eingesetzte Kupfer(II)-Konzentration. Durch Substitution von  $[Cu_{aq}^{2+}]$  in Gleichung (4.7) durch die Ausdrücke in Gleichung (4.5) und (4.8) wird eine quadratische Gleichung erhalten, dessen physikalisch sinnvolle Lösung lautet:

$$\theta_b = 1 + \frac{{}^cK_D + [Cu_{ges}^{2+}] - [L_{ges}]}{2[L_{ges}]} - \sqrt{\left(\frac{{}^cK_D + [Cu_{ges}^{2+}] - [L_{ges}]}{2[L_{ges}]}\right)^2 + \frac{{}^cK_D}{[L_{ges}]}} \quad (4.9)$$

Der Besetzungsgrad  $\theta_b$  hängt somit nur noch von den Gesamtkonzentrationen ab.

Da die betrachteten Messgrößen  $X$  (Fluoreszenzintensität  $I_{Fl}$ , mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{Fl}$  und Teilchenzahl  $N$ ) Gleichung (4.2) erfüllen, kann  $X$  geschrieben werden als Summe der gewichteten Anteile der Messgröße  $X$  in Anwesenheit von 0 eq ( $X_0$ ) des Analyten sowie bei voller Besetzung des Liganden ( $X_I$ ) mit Analyt.

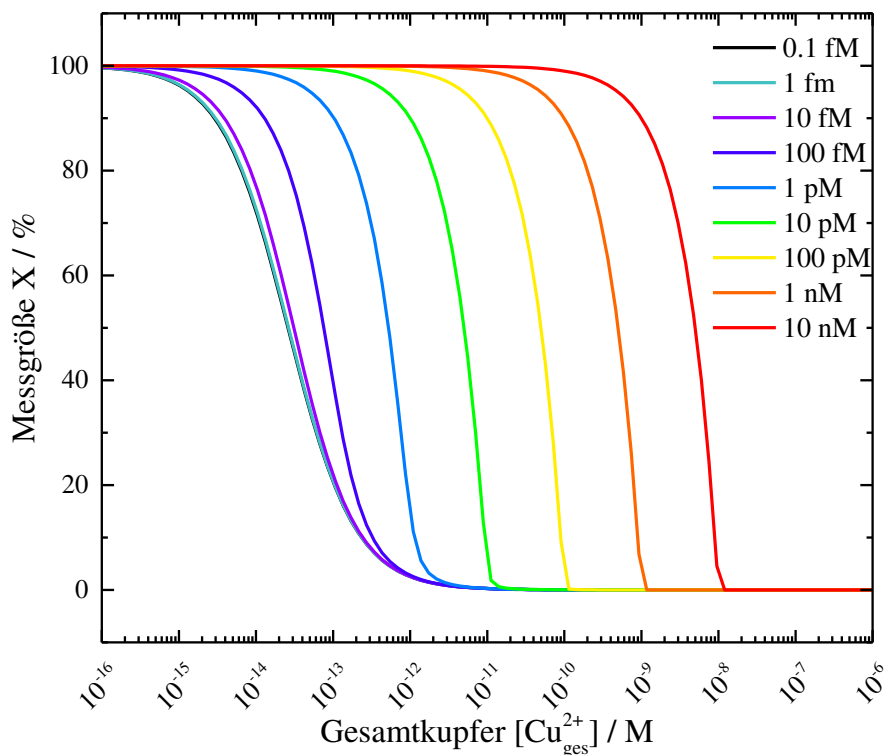
$$X = \theta_f X_0 + \theta_b X_1 \quad (4.10)$$

$$\theta_b = \frac{X_0 - X}{X_0 - X_1} \quad (4.11)$$

Bei Kenntnis der Gesamtkonzentrationen von Ligand und Analyt kann Gleichung (4.9) umgeschrieben werden zu Gleichung (4.12). Somit kann  $K_D$  (bzw. bei Kenntnis von  $K_D$  die Analytkonzentration) direkt aus der Messgröße  $X$  bestimmt werden.

$$X = X_0 - \left( 1 + \frac{{}^cK_D + [Cu_{ges}^{2+}] - [L_{ges}]}{2[L_{ges}]} - \sqrt{\left( \frac{{}^cK_D + [Cu_{ges}^{2+}] - [L_{ges}]}{2[L_{ges}]} \right)^2 + \frac{{}^cK_D}{[L_{ges}]}} \right) (X_0 - X_1) \quad (4.12)$$

Nähere Betrachtung von Gleichung (4.12) zeigt auf, dass für den Fall  $K_D \ll [L_{ges}]$  die Dissoziationskonstante keine Rolle mehr spielt und Form sowie Aussehen nur von  $[L_{ges}]$  abhängen.



**Abbildung 4-18** Simulation der Abnahme der Messgröße  $X$  beschrieben durch Gleichung (4.12) bei konstanter Dissoziationskonstante  ${}^cK_D = 26 \text{ fM}$  und variierender Gesamtligandkonzentration  $[L_{ges}]$ .

In Abbildung 4-18 sind nach Gleichung (4.12) simulierte Titrationskurven für das betrachtete System aus Gleichung (4.2) gegeben. Für  $K_D$  wurde die von Trapaidze *et al.*<sup>[237]</sup> experimentell bestimmte konditionelle Dissoziationskonstante für den DAHK-Cu-Komplex von  ${}^cK_D = 26 \text{ fM}$  ( $pH = 7.4$ ) verwendet. Ist die Gesamtligandkonzentration sehr viel größer als die Dissoziationskonstante, greift der Ligand zu stark in das Komplexgleichgewicht ein, indem er dem Gleichgewicht direkt die Gesamtkupferkonzentration vollständig entzieht. Gleichzeitig wird die Konzentration des freien Liganden nur geringfügig beeinflusst, so dass es nur zu einer marginalen Abnahme des Signals kommt. Erst ab einer  $[Cu_{ges}^{2+}] \approx [L_{ges}]$  wirkt sich die Zugabe des Analyten merklich auf das Messsignal aus. Es ist also nicht ohne weiteres möglich, Fluoreszenzsensoren mit extrem hohen Affinitäten gegenüber ihrem Analyten zu charakterisieren, da hier bei extrem geringen Sensorkonzentrationen gearbeitet werden muss. Das führt wiederum zu einem extrem niedrigen Signal und damit zu einem schlechten S/N-Verhältnis führt.

Es existieren aber Titrationstechniken oder besser gesagt Hilfsmittel, die dieses Problem umgehen können:

- Verdrängungstitrationen: Mit Hilfe der Verdrängungstitration, kombiniert mit ITC, konnten von Trapaidze *et al.*<sup>[237]</sup> die oben schon erwähnte konditionelle Dissoziationskonstante von  ${}^cK_D = 26 \text{ fM}$  ( $pH = 7.4$ ) für den DAHK-Cu-Komplex bestimmt werden. Bei dieser Technik wird eine definierte Menge Kupfer und DAHK in Gegenwart einer großen Menge eines schwächeren Liganden  $[C]$  (in diesem Fall die Aminosäure Glycin) vermischt und die freiwerdende Reaktionsenthalpie per Mikrokalorimetrie gemessen. Durch das Einführen eines Kompetitors  $[C]$  in das System eröffnen sich neue, mit der DAHK-Cu-Komplexbildung in Konkurrenz tretende, Komplexgleichgewichte. Zur Auswertung wird Gleichung (4.13), eine leicht modifizierte Version von Gleichung (4.7) verwendet.

$$\theta_{b,Cu} = \frac{[CuL^{2+}]}{[Cu_{ges}^{2+}]} = \frac{{}^{app}K_D[L_{ges}]}{1 - {}^{app}K_D[L_{ges}]} \quad (4.13)$$

Hier findet sich der Ausdruck  ${}^{app}K_D$  wieder. Dies ist die experimentell ermittelte scheinbare (*apparent*) Dissoziationskonstante. In dieser Konstante stecken sämtliche, um das DAHK-Cu-Komplexgleichgewicht, konkurrierende Gleichgewichte und sie ist, je nach eingesetztem Kompetitor, um ein Vielfaches höher als  ${}^cK_D$ . Dadurch wird das oben beschriebene Problem umgangen und es kann ohne Schwierigkeiten  ${}^{app}K_D$  experimentell bestimmt werden. Bei Kenntniss der Konkurrenzgleichgewichte – bekannt aus dem Design des Experiments – lässt leicht die gesuchte  ${}^cK_D$  gemäß Gleichung (4.14) berechnen. Hier steht  $[B]$  allgemein für Pufferbestandteile, welche auch einen Einfluss auf das Gleichgewicht haben können.

$${}^{app}K_D = {}^cK_D \left( 1 + \sum_i^n \frac{[C]^i}{\prod_j^i {}^cK_D^C} + \sum_p^m \frac{[B]^p}{\prod_p^q {}^cK_D^B} \right) \quad (4.14)$$

- Metallionenpuffer: Die zweite – und in dieser Arbeit verwendete Möglichkeit – liegt in der Anwendung von Metallionenpuffern. Ähnlich wie klassische pH-Puf-

fer den  $pH$ -Wert einer Lösung stabil halten, können Metallionenpuffer dazu dienen, den  $pM$ -Wert einer Lösung stabil zu halten. Diese Methode soll im weiteren näher beschrieben werden.

Da bei der Reaktion eines Pufferliganden  $[B]$  mit einem Metall  $[M]$  auch die in Lösung befindlichen Protonen mit dem Metall um die Bindung an den Liganden konkurrieren, ist es im Experiment notwendig, sowohl die Protonenkonzentration (den  $pH$ -Wert) konstant zu halten als auch die Komplexbildungskonstanten  $K_D$  und Protonierungskonstanten  $pK_s$  des Pufferliganden zu kennen. Sind diese Voraussetzungen erfüllt, kann mit Hilfe der von Schwarzenbach<sup>[275]</sup> entwickelten  $\alpha$ -Koeffizientenmethode in einfacher Weise der  $pM$ -Wert eines wohldefinierten Systems berechnet werden nach<sup>[276]</sup>:

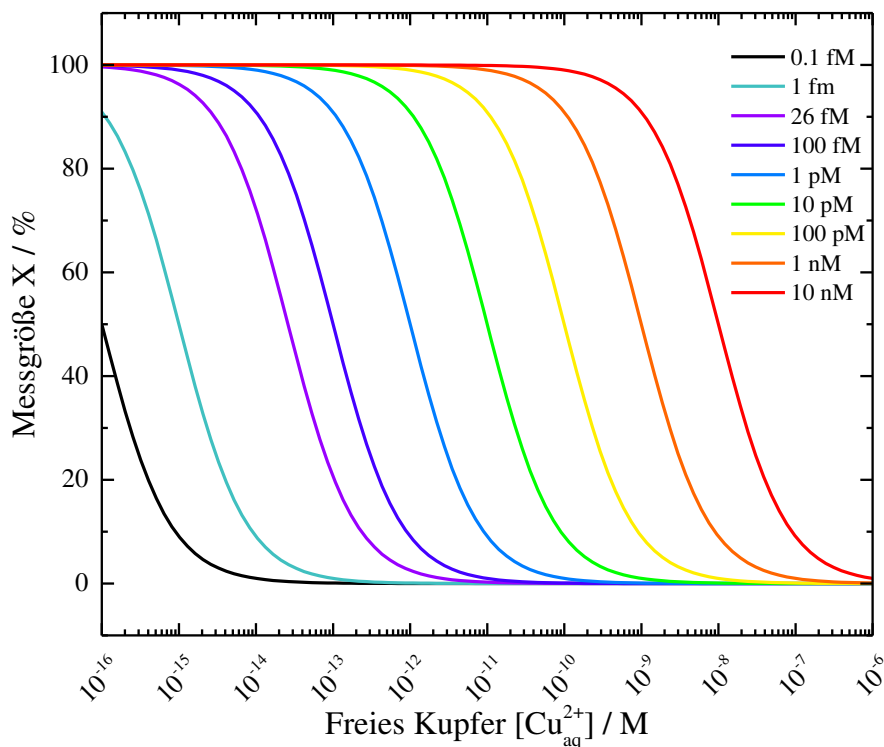
$$pM = \log \beta + \log \left[ \frac{B_{ges}}{M_{ges}} \right] - \log[\alpha_L \alpha_M] \quad (4.15)$$

$$\text{mit } \beta = \frac{[MB]}{[M][B]} \quad (4.16)$$

$$\text{und } \alpha_L = \sum_i^n 10^{-ipH + \sum_j^i pK_{aj}} \text{ und } \alpha_M = \sum_i^n 10^{ipH - \sum_j^i pK_{aj}} \quad (4.17)$$

Angewendet auf die o.g. Problemstellung bedeutete das konkret, dass ein geeigneter Metallionenpuffer in der Lage ist, die Kupfer(II)-Konzentration konstant zu halten. Durch das Verhältnis der Gesamtpufferkonzentration zu der Gesamtmetallkonzentration kann ein genau definierter  $pCu^{2+}$ -Wert eingestellt werden. Dieser  $pCu^{2+}$ -Wert entspricht der freien Kupfer(II)-Konzentration. Das wiederum bedeutet, dass nun Gleichung (4.7) bzw. untenstehende Gleichung (4.18) direkt verwendet werden kann, um die gesuchte konditionelle Dissoziationskonstante aus dem Messsignal  $X$  zu bestimmen.

$$X = X_0 - \frac{[Cu_{aq}^{2+}]}{cK_D + [Cu_{aq}^{2+}]} (X_0 - X_1) \quad (4.18)$$



**Abbildung 4-19** Simulation der Abnahme der Messgröße  $X$  beschrieben durch Gleichung (4.18) bei variierender  $cK_D$ .

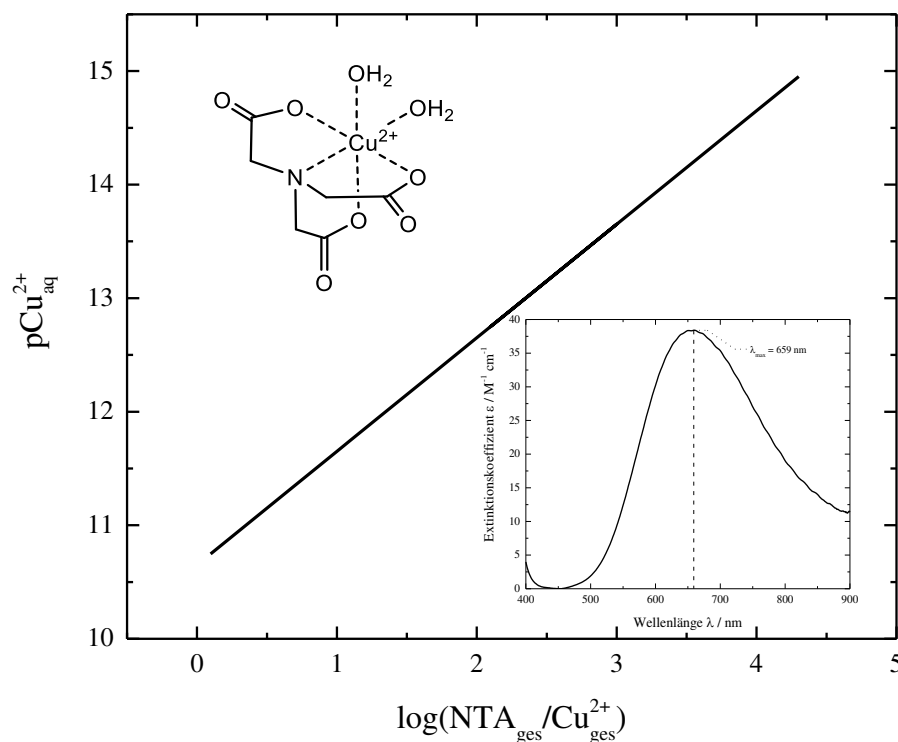
Oben gezeigte Abbildung 4-19 spiegelt den Verlauf der Titrationsgleichung (4.18) in Abhängigkeit der freien Kupferkonzentration gegeben durch Gleichung (4.15) wieder. Es ist zu erkennen, dass bei Kontrolle des freien Kupfers in Lösung der Wendepunkt der Kurve nur von der Komplexbildungskonstante und nicht mehr von der Ligandenkonzentration abhängig ist. Natürlich ist darauf zu achten, dass die Gesamtligandenkonzentration kleiner bleibt als die Konzentration der Metallionenpuffer.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante des DAHK-BDPY-Cu-Komplexes wurde Nitrilotriessigsäure (NTA) als Metallionenpuffer ausgewählt. NTA bildet mit Kupfer(II)-Ionen stabile 1:1-Komplexe mit einer Bildungskonstante von  $\log\beta = 13.1$  sowie Säurekonstanten  $pK_{s,1} = 1.89$ ,  $pK_{s,2} = 2.49$  und  $pK_{s,3} = 9.75$ .<sup>[276]</sup>





Die Herstellung des Puffers ist denkbar einfach und erfolgt durch Vermischen zweier Stammlösungen – NTA und CuNTA<sup>-</sup> – in verschiedenen Verhältnissen (s. Abbildung 4-20).



**Abbildung 4-20** Einfluss des Verhältnisses  $\log ([\text{NTA}_{\text{ges}}]/[\text{Cu}^{2+}_{\text{ges}}])$  auf den  $\text{pCu}^{2+}$ -Wert bei einer festen  $[\text{NTA}^{3-}] = 0.1\text{mM}$  Konzentration bei  $\text{pH} = 7.413$  und  $I = 154\text{ mM NaCl}$ . Der Einsatz rechts unten zeigt das Absorptionsspektrum des CuNTA<sup>-</sup>-Komplexes mit einem  $\lambda_{\text{max}} = 659\text{ nm}$  und einem Extinktionskoeffizienten<sup>[277]</sup>  $\epsilon_{659\text{ nm}} = 38.4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

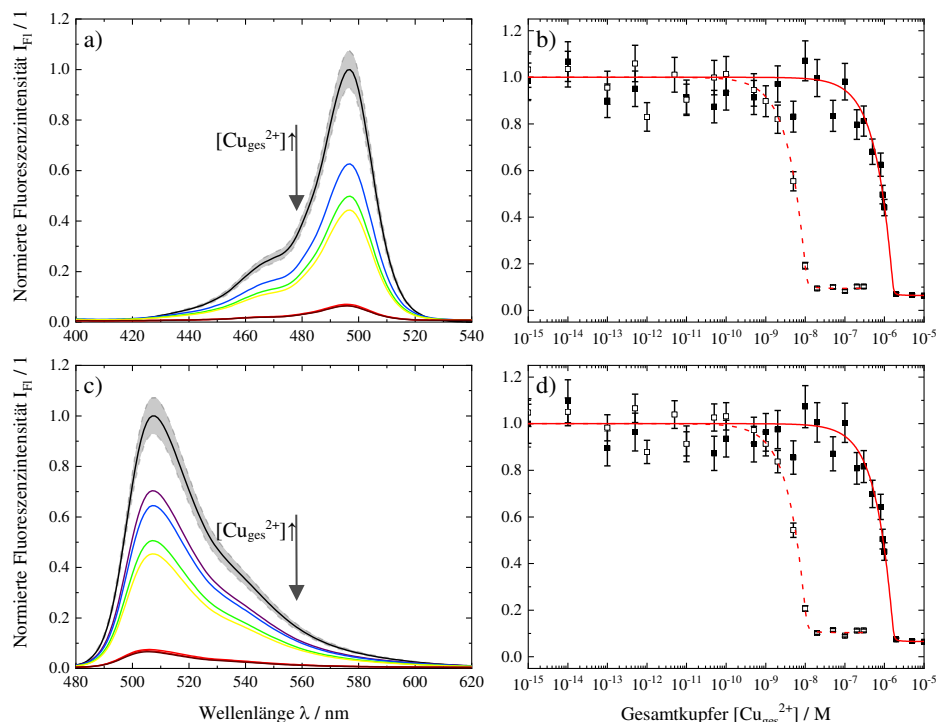
#### 4.2.3.2 Ergebnisse der Fluoreszenztitrationen

Nach obiger Beschreibung des Massenwirkungsgesetzes und der Einführung des Kupfer(II)-Kationenpuffersystems CuNTA<sup>-</sup>/NTA<sup>3-</sup> sollen nun die vorangegangenen Überlegungen und Thesen überprüft werden. Bisher wurde gezeigt, dass das DAHK-BDPY-System sich wie gewünscht verhält (vgl. Abschnitte 2.5, 4.1.3, 4.2.1 und 4.2.2). Nun ist es daran zu überprüfen, ob der DAHK-BDPY-Cu-Komplex eine ähnlich Dissoziationskonstante aufweist und sich in Gegenwart von einer ansteigenden Konzentration an Kupfer(II)-Kationen verhält wie vorhergesagt. Dazu wird zuerst eine klassische Fluoreszenztitration durchgeführt, bei der die Abnahme des Emissions- bzw. Anregungsmaximums betrachtet wird. Die Titrationen wurden fünf Mal durchgeführt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung des Messwertes berechnet. Die Messungen wurden, wie schon zuvor

beschrieben, bei physiologischen Bedingungen (PBS-Puffer  $pH = 7.413$ ,  $I = 154\text{mM}$  NaCl) in Abwesenheit und in Anwesenheit des  $\text{CuNTA}^-/\text{NTA}^{3-}$ -Metallionenpuffers durchgeführt.

Unten stehende Abbildung 4-21 zeigt die spektrale Antwort des DAHK-BDPY-Sensors auf die Erhöhung der Kupferkonzentration in Lösung. Die Anregungs- bzw. Emissionsspektren schwanken bei sehr kleinen Kupferkonzentrationen um einen Mittelwert. Gut zu erkennen ist dies in Abbildung 4-21 b) und d). Hierbei handelt es sich vor allem um Schwankungen, verursacht durch Volumenunsicherheiten bei der Probenlösungherstellung. Um diese Tatsache zu berücksichtigen und die Darstellung der Spektren nicht zu unübersichtlich zu gestalten, wurden die aufgezeichneten Spektren bis zu einer merklichen Abnahme der Intensität gemittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-21 a) und c) zu sehen. Schwarz dargestellt ist der Mittelwert der Spektren sowie grau hinterlegt die Standardabweichung.

Aus den Graphen lässt sich schließen, dass bei Erhöhung der Gesamtkupferkonzentration die maximale Fluoreszenzintensität sprunghaft abnimmt, sobald eine kritische Konzentration überschritten ist. Die Auftragung der Maxima gegen die Gesamtkupferkonzentration zeigt diesen Sachverhalt deutlicher. Das Experiment wurde mit zwei verschiedenen Sensorkonzentrationen durchgeführt und an Gleichung (4.12) angepasst. Beide Experimente verhalten sich wie im vorherigen Abschnitt vorhergesagt und der Verlauf der Titration ist nur abhängig von der Konzentration des Sensors.



**Abbildung 4-21** Abnahme des Anregungsspektrums a) ( $\lambda_{em} = 550$  nm) und des Emissionsspektrums c) ( $\lambda_{ex} = 470$  nm) bei sukzessiver Erhöhung der  $[Cu_{ges}^{2+}]$ -Konzentration. In b) und d) sind die Anregungs- bzw. Emissionsmaxima gegen die Gesamtkupfer(II)-Konzentration aufgetragen bei zwei unterschiedlichen Ligandkonzentrationen. Die Konzentrationen betragen im ersten, mit den schwarzen gefüllten Quadraten gekennzeichneten, Experiment  $1 \mu M$  und im zweiten, mit den offenen Quadraten gekennzeichneten, Experiment  $10 nM$ . Aufgetragen sind die Mittelwerte samt Standardabweichungen von je fünf Messdaten, welche mit Gleichung (4.12) angepasst sind.

Die aus der Anpassung erhaltenen Werte der Dissoziationskonstanten und Sensorkonzentrationen sind in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben.

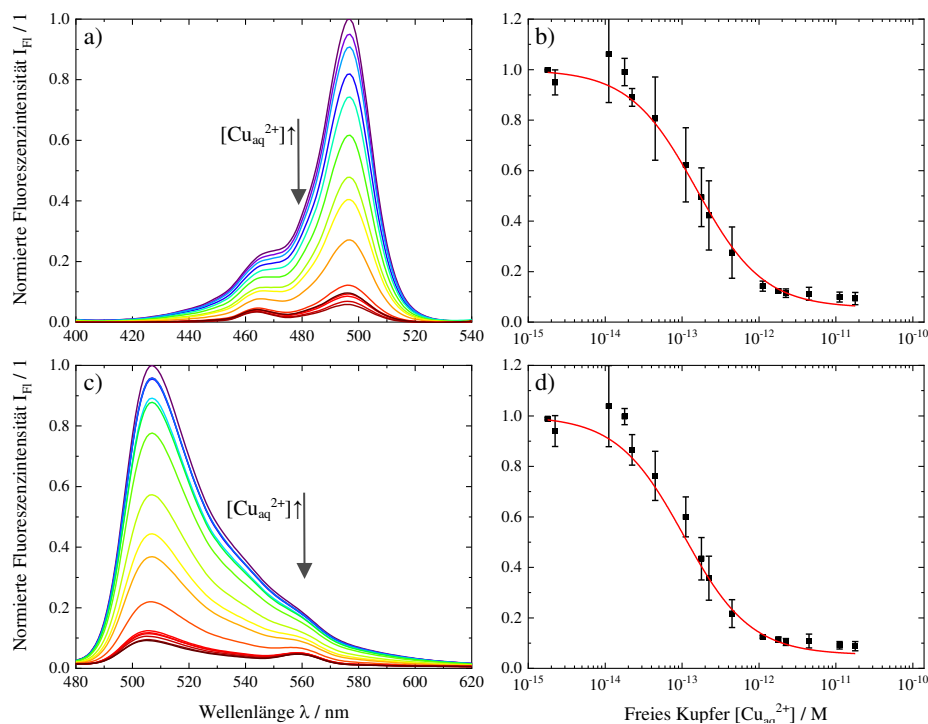
**Tabelle 4-4** Ergebnisse aus der Anpassung von Gleichung (4.12) and die experimentellen Daten.

	Experiment 1 [DAHK-BDPY] = $1 \mu M$		Experiment 2 [DAHK-BDPY] = $10 nM$	
	Emission	Anregung	Emission	Anregung
$K_D / [nM]$	$2.71 \pm 2.72$	$2.31 \pm 3.03$	$0.04 \pm 0.08$	$0.03 \pm 0.08$
[DAHK-BDPY]	$1.72 \pm 0.08 \mu M$	$1.68 \pm 0.09 \mu M$	$10.89 \pm 0.75 nM$	$10.85 \pm 0.74 nM$
$\chi^2$	0.96	1.25	1.75	1.10

Die erhaltenen Ligandkonzentrationen passen sehr gut mit den eingesetzten Konzentrationen überein, wohingegen die bestimmten Dissoziationskonstanten in den Experimenten unterschiedlich groß sind und mit einem Fehler behaftet sind, der größer als die eigentliche Dissoziationskonstante ist. Diese Titrationsart ist also zur Bestimmung der Dissoziationskonstante des Systems ungeeignet. Das spiegelt sich auch in der Tatsache wider, dass

die Anpassungsfunktion (4.12) die gleichen Parameter liefert, wenn die Werte für die Dissoziationskonstante auf den Literaturwert oder sogar auf 0 gesetzt werden. Der Grund für dieses Verhalten liegt darin, dass der Überschuss an Sensor und die sehr geringe Dissoziationskonstante direkt in das Analytgleichgewicht eingreifen. Näher erläutert wurde diese Tatsache bereits bei der Betrachtung des MWG in Abschnitt 4.2.3.1.

Wird nun der Metallionenpuffer zur Einstellung der freien Kupfer(II)-Konzentration verwendet, zeichnet sich ein anderes Bild ab. Wie in Abbildung 4-22 zu erkennen, kommt es bei Verwendung des NTA-Metallionenpuffers zu einer graduellen Abnahme der Maxima der Anregungs- bzw. Emissionsspektren in Abhängigkeit einer steigenden freien Kupfer(II)-Konzentration. Werden die aus den Messreihen erhaltenen Datenpunkte mit Hilfe von Gleichung (4.18) angepasst, ergibt sich der schon in Abbildung 4-19 simulierte Kurvenverlauf. Beide Regressionsanalysen resultieren in einer guten Anpassung des Modells an die Messdaten (Abbildung 4-22 b)  $\chi^2 = 1.37$  und d)  $\chi^2 = 2.52$ ). Die erhaltenen Dissoziationskonstanten aus den Messreihen der Anregungs-, bzw. Emissionsspektren betragen  ${}^cK_{D,ex} = 140 \pm 13$  fM ( $\log K_{D,ex} = -12.85 \pm 0.04$ ) bzw.  ${}^cK_{D,em} = 105 \pm 18$  fM ( $\log K_{D,em} = -12.98 \pm 0.07$ ).



**Abbildung 4-22** Abnahme des Anregungsspektrums a) ( $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$ ) und des Emissionsspektrums c) ( $\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$ ) bei Steigerung der  $[\text{Cu}_{aq}^{2+}]$ -Konzentration kontrolliert mit dem Metallionenpuffersystem  $\text{CuNTA}^-/\text{NTA}^{3-}$ . In b) und d) sind die Anregungs- bzw. Emissionsmaxima gegen die freie Kupfer(II)-Konzentration aufgetragen. Aufgetragen sind die Mittelwerte samt Standardabweichungen von je fünf Messdaten, welche mit Gleichung (4.18) angepasst sind.

Die durchgeführten klassischen Fluoreszenztitrationen sollen vorrangig dazu dienen die verwendeten Modelle und Annahmen zu überprüfen sowie erste Informationen über die Bindungskonstanten zu erhalten.

Ohne die Verwendung eines Metallionenpuffers „versagen“, wie vorhergesagt, die Regressionsanalysen und es wird lediglich die Konzentration des Liganden selbst bestimmt.

Wird jedoch die freie Kupfer(II)-Konzentration durch das  $\text{CuNTA}^-/\text{NTA}^{3-}$ -System eingestellt, können die entsprechenden konditionellen Dissoziationskonstanten bestimmt werden. Verglichen mit den literaturbekannten Werten für die Dissoziationskonstante ( $\log^c K_D = -13.6^{[237]}$  und  $\log^c K_D = -13.8^{[90]}$ ) des DAHK-Cu-Komplexes weichen die erhaltenen Ergebnisse um den Faktor sechs ab. Eine genaue Diskussion über die Gründe der Abweichung soll in Kapitel 5 erfolgen. Es ist trivial zu erwähnen, dass sich die erhaltenen Werte – bestimmt mit Hilfe der Anregungs- bzw. Emissionsspektren – voneinander kaum unterscheiden, da diese von den gleichen Proben stammen.

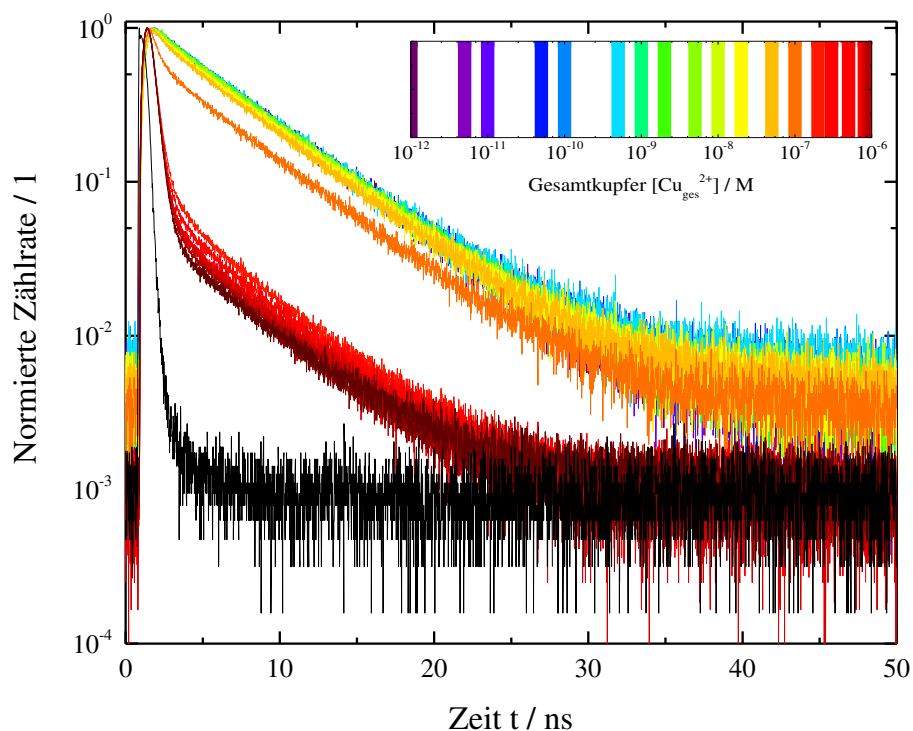
#### 4.2.4 Fluoreszenzlebensdauertitrationsen *in vitro*

Im vorherigen Abschnitt wurde die Reaktion und spektrale Antwort des Sensors bei Erhöhung der Gesamt- bzw. der freien Kupfer(II)-Konzentration betrachtet. Wichtiger, vor allem im Hinblick auf die FLCS, ist die Untersuchung der Fluoreszenzlebensdauer bzw. deren Änderung bei Erhöhung der Analytkonzentration.

Nachfolgende Experimente wurden mit dem in Abschnitt 3 beschriebenen TCSPC-Aufbau bzw. Mikroskop-Aufbau unter Magic Angle Bedingungen durchgeführt. Das erste Experiment wurde in Abwesenheit des Metallionenpuffersystems und das zweite in dessen Anwesenheit durchgeführt. Die Messbedingungen stimmten für beide Experimente überein ( $\lambda_{ex} = 470$  nm,  $f = 20$  MHz,  $\lambda_{em} = 525 \pm 50$  nm,  $P = 40$   $\mu$ W). Die Sensorkonzentration betrug im ungepufferten Fall  $[\text{DAHK-BDPY}] = 300$  nM,  $pH$  sowie Ionenstärke entsprachen denen der vorherigen Experimente. Die erhaltenen TCSPC-Zerfälle wurden mit einem biexponentiellen Rekonvolutionsverfahren gemäß Gleichung (2.16) und (2.17) angepasst. Die abgebildeten Daten entsprechen den arithmetischen Mitteln von fünf unabhängigen Messungen, die abgebildeten Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen dieser Mittelwerte.

Unten stehende Abbildung 4-23 zeigt die normierten Fluoreszenzzerfälle des ersten elektronisch angeregten Zustandes des DAHK-BDPY-Systems sowie die IRF (schwarz) des Experiments in Abwesenheit des Metallionenpuffers. .

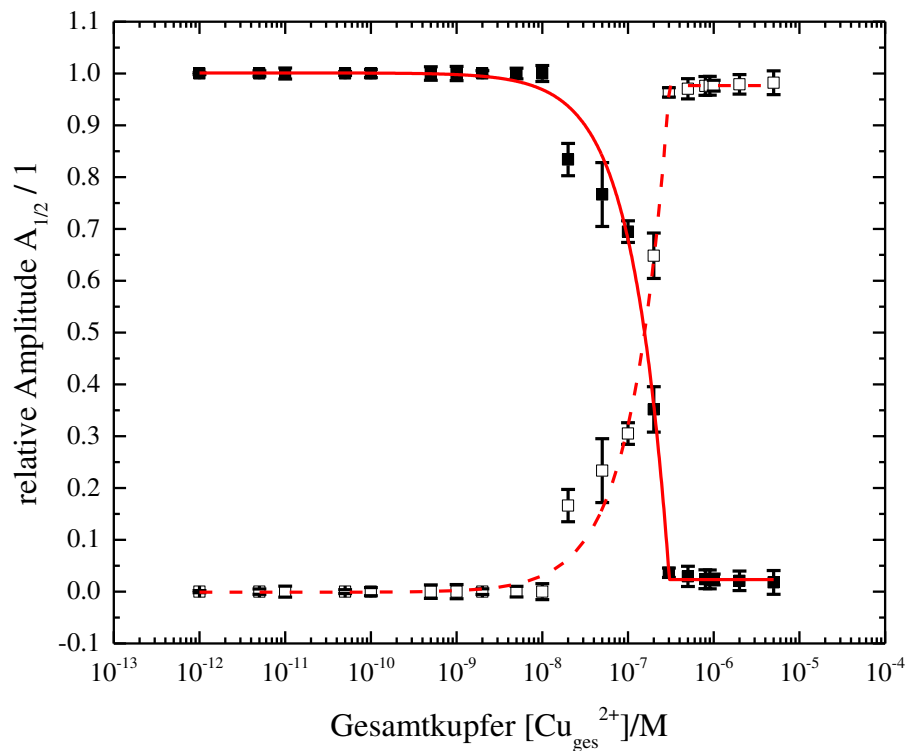
Verglichen mit den Fluoreszenzspektren des Systems verhalten sich die Fluoreszenzzerfälle diesen analog. Erst ab einer kritischen Konzentration bildet sich ein deutliches biexponentielles Verhalten aus. Bei Überschreiten dieser Konzentration (orangefarbene Kurve) nimmt die Amplitude des Zerfalls des DAHK-BDPY-Cu-Komplexes schlagartig zu und gleichzeitig die Amplitude des *apo*-DAHK-BDPY ab.



**Abbildung 4-23** Normierte Fluoreszenzerfälle des DAHK-BDPY-Cu-Systems bei steigender Gesamtkupferkonzentration. Die Analytkonzentration nimmt von der blauen zur dunkelroten Kurve hin zu. Die IRF des experimentellen Aufbaus ist in schwarz wiedergegeben.

Deutlicher wird dieses Verhalten bei Auftragung der Amplituden (Abbildung 4-24) bzw. der mittleren Lebensdauer (Abbildung 4-25) gegen die Gesamtkupferkonzentration.

Die Amplitude  $A_1$  der langen Lebensdauerkomponente (schwarze Quadrate) nimmt in dem Maße ab wie die Amplitude  $A_2$  der kurzen Lebensdauerkomponente (offene Quadrate) ansteigt. Dies ist aber nicht weiter überraschend und folgt als direkte Konsequenz aus der Definition der Lebensdaueramplituden.



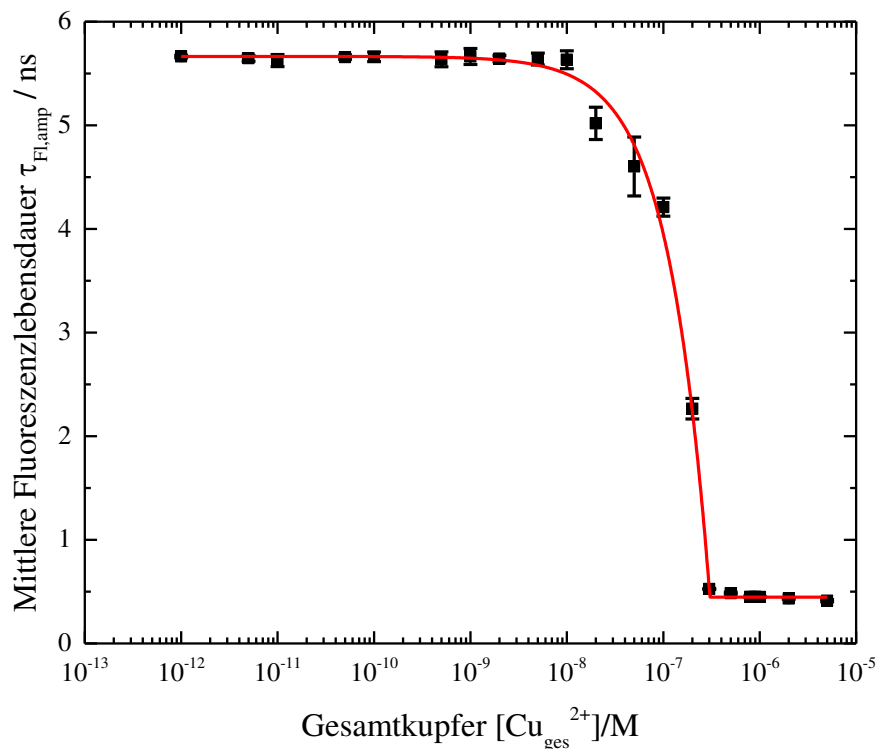
**Abbildung 4-24** Auftragung der Amplituden  $A_{1/2}$  erhalten aus den biexponentiellen Anpassungen der experimentellen Fluoreszenzzerfälle für *apo*-DAHK-BDPY (schwarze Quadrate) und DAHK-BDPY-Cu (offene Quadrate) sowie die Anpassung der Daten an Gleichung (4.12).

Die in Abbildung 4-25 aufgetragene amplitudengewichtete mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{av,amp}$  liefert exakt den gleichen Kurvenverlauf und Werte für die Sensorkonzentration. Grund dafür liegt in der Definition von  $\tau_{av,amp}$ .

$$\tau_{Fl,amp} = \frac{\sum A_i \tau_{Fl,i}}{\sum A_i} \quad (4.20)$$

Da die Fluoreszenzlebensdauern des *apo*-DAHK-BDPY und des DAHK-BDPY-Cu molekulspezifische Größen sind und sich nur deren Konzentrationsverhältnis (d.h. Amplitudenverhältnis) bei steigender Kupferkonzentration ändert, hängt  $\tau_{Fl,amp}$  also nur von diesem ab.





**Abbildung 4-25** Auftragung der amplitudengewichteten mittleren Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{Fl,amp}$  gegen die Gesamtkupferkonzentration sowie Anpassung der Daten an Gleichung (4.12).

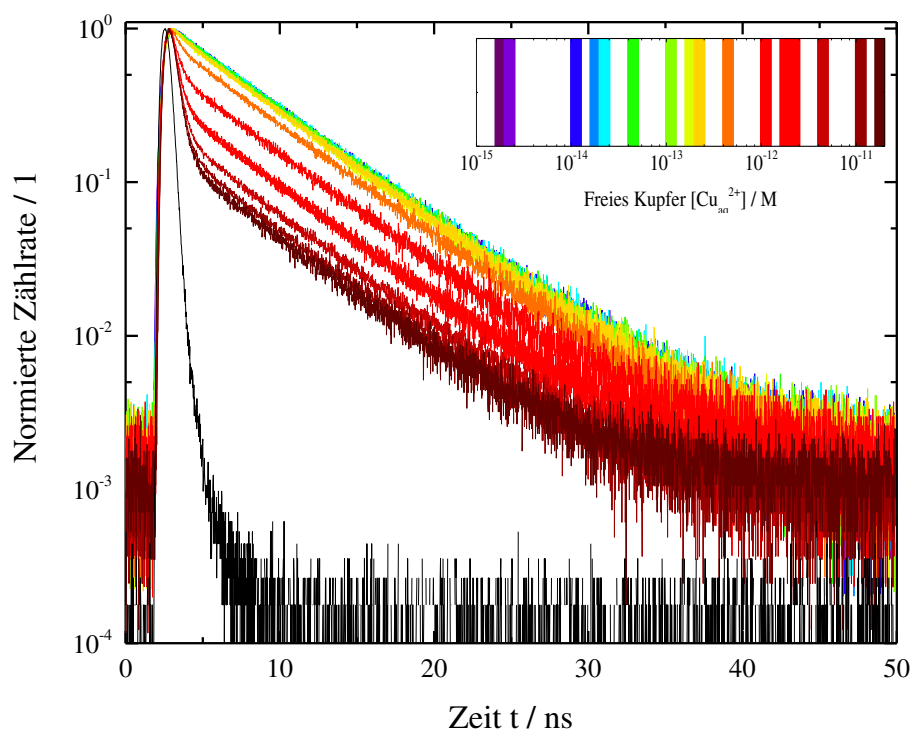
Die Ergebnisse dieser Anpassungen – zusammengefasst in Tabelle 4-5 – liefern wieder wie zuvor die eingesetzte Sensorkonzentration, versagen jedoch bei der Bestimmung der Dissoziationskonstante.

**Tabelle 4-5** Ergebnisse der Lebensdauertitrationsen. Für den Parameter  ${}^cK_D$  versagen die Anpassungen. Deutlich durch einen Fehler, der um fünf Größenordnung größer als der eigentliche Parameter ist.

	Amplitude $A_{1/2}/I$	Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{av,amp} / ns$
${}^cK_D / fM$	$1.00 \pm 200000$	$1.00 \pm 200000$
$[DAHK-BDPY] / nM$	$304 \pm 16$	$305 \pm 13$
$\chi^2$	1.22	2.80

Wie auch schon bei der Betrachtung der spektralen Antwort des *apo*-DAHK-BDPY auf eine steigende freie Kupferkonzentration (kontrolliert durch das  $NTA^{3-}/CuNTA^-$  - System), nimmt das detektierte Signal kontinuierlich ab. Abbildung 4-26 zeigt eben jenes Verhalten an Hand der detektieren Fluoreszenzzerfälle. In diesem Experiment betrug die

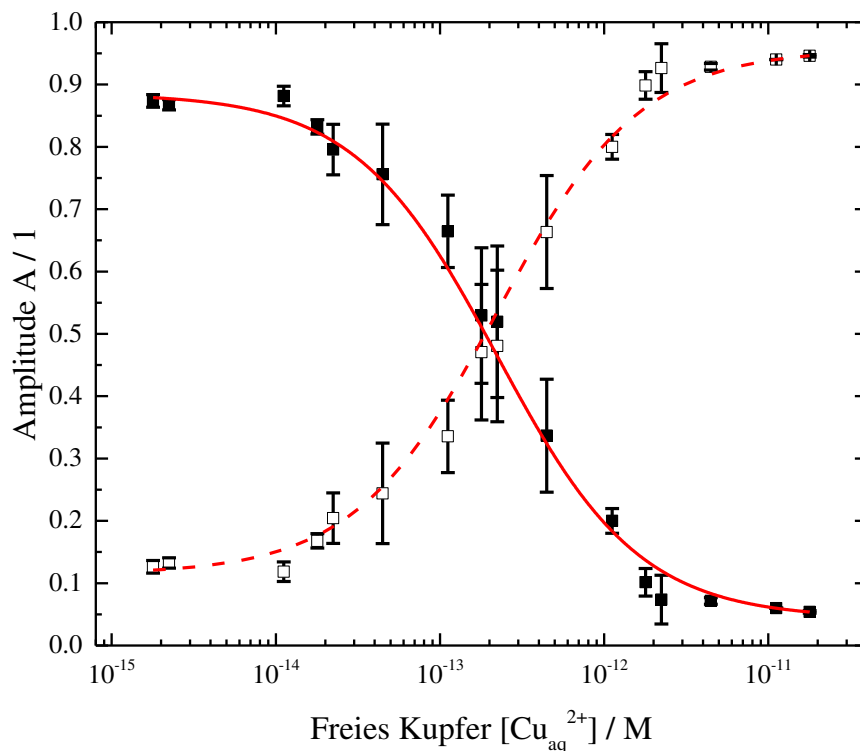
Konzentration des Sensors ca. 15 nM in PBS-Puffer<sup>4</sup>. Die Konzentration von freien Kupfer(II)-Kationen wurden, wie zuvor beschrieben, eingestellt und nimmt von der blauen hin zur dunkelroten Kurve zu. Das Ergebnis der Erhöhung der freien Kupfer(II)-Konzentration ist der graduelle Anstieg der kurzen Lebensdauerkomponente ( $\tau_{FI} = 0.46 \pm 0.19$  ns) des DAHK-BDPY-Cu-Komplexes bzw. Abfall der langen Lebensdauerkomponente ( $\tau_{FI} = 5.88 \pm 0.12$  ns) des *apo*-DAHK-BDPY.



**Abbildung 4-26** Normierte Fluoreszenzerfälle des DAHK-BDPY-Cu-Systems bei steigender freier Kupferkonzentration in Anwesenheit des Metallionenpuffers. Die Analytkonzentration nimmt von der blauen zur dunkelroten Kurve hin zu. Die IRF des experimentellen Aufbaus ist in schwarz wiedergegeben.

Werden die so gewonnenen Daten einem biexponentiellen Rekonvolutionsfit unterzogen und die daraus erhaltenen Amplituden, bzw. mittleren amplitudengewichteten Fluoreszenzlebenszeiten gegen die freie Kupfer(II)-Konzentration aufgetragen, so werden die in Abbildung 4-27 und Abbildung 4-28 dargestellten Daten erhalten.

<sup>4</sup> Im Vergleich zum vorherigen Experiment ist die Farbstoffkonzentration um den Faktor 20 geringer. Die geringe Konzentration von 15 nM wurde gewählt, da das Experiment am Mikroskopaufbau durchgeführt wurde. Dieser Aufbau ist aufgrund der starken Fokussierung des Laserstrahls in die Probe und der guten Einsammeleffizienz des verwendeten Objektivs um einiges empfindlicher und benötigt geringere Farbstoffkonzentrationen.



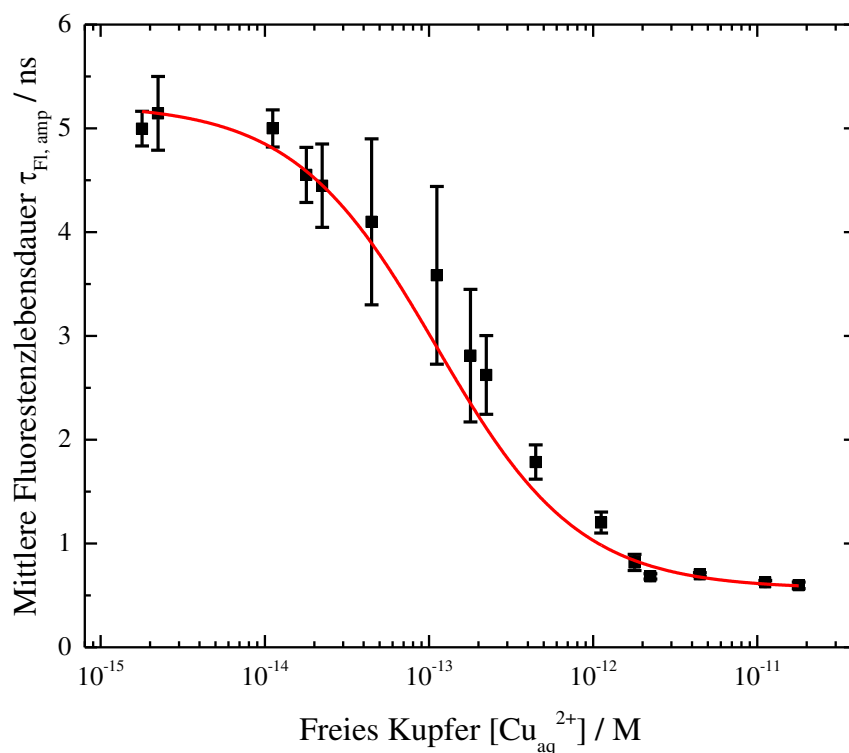
**Abbildung 4-27** Die Lebensdaueramplituden des *apo*-DAHK-BDPY-Cu (schwarze Quadrate) und des DAHK-BDPY-Cu-Komplexes (weiße Quadrate) in Abhängigkeit der freien Kupfer(II)-Konzentration.

Die Amplituden der gemessenen Fluoreszenzzerfälle sind in obiger Abbildung dargestellt. Die schwarzen Quadrate stellen die abnehmende Amplitude der langen Lebensdauerkomponenten des *apo*-DAHK-BDPY dar, die weißen Quadrate die steigende Amplitude der kurzen DAHK-BDPY-Cu Lebensdauerkomponente. Auffällig hierbei ist, dass selbst bei femtomolaren freien Kupfer(II)-Konzentrationen die Amplitude des DAHK-BDPY-Cu-Komplexes nicht Null ist. Ebenso sinkt bei hohen freien Kupfer(II)-Konzentrationen die Amplitude des *apo*-DAHK-BDPY nicht auf Null ab.

Der Grund für dieses Verhalten liegt vermutlich in einem sich ausbildenden Gleichgewicht zwischen dem  $\text{CuNTA}^-$ -Komplex und dem DAHK-BDPY-Sensor. Die  $\log K_D$  der Nitrilotriessigsäure und des DAHK-BDPY-Sensors gegenüber Kupfer liegen beide in einem ähnlichen Bereich ( $\log K_D(\text{CuNTA}^-) = -13.1$  und  $\log^\circ K_{D,\text{lem}}(\text{DAHK-BDPY-Cu}) = -12.98 \pm 0.07$ ). Das bedeutet, der DAHK-BDPY-Sensor tritt in Konkurrenz zu dem  $\text{CuNTA}^-/\text{NTA}^{3-}$ -Gleichgewicht des Metallionenpuffers, obwohl dieser in sehr großem Überschuss vorliegt. Dafür spricht auch, dass diese Beobachtung ohne Metallionenpuffer nicht gemacht wird.

Werden nun die Amplituden mit Gleichung (4.18) angepasst, wird eine Dissoziationskonstante  ${}^cK_{D,A} = 223 \pm 27 \text{ fM}$  ( $\chi^2 = 1.43$ ) erhalten.

Ähnliches Verhalten zeigt auch die Betrachtung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer. Die mittlere Lebensdauer des ersten Messpunktes ist mit  $\tau_{av,amp} = 5.00 \pm 0.16 \text{ ns}$  geringer als die Fluoreszenzlebensdauer des reinen *apo*-DAHK-BDPY ( $\tau_{Fl} = 5.76 \pm 0.01 \text{ ns}$ ). Verursacht wird dies durch den schon oben beschriebenen Anteil an DAHK-BDPY-Cu-Komplex, der am ersten Messpunkt schon vorliegt.



**Abbildung 4-28** Abnahme der mittleren Fluoreszenzlebensdauer bei Zunahme der freien Kupfer(II)-Konzentration.

Aus der Anpassung der Messwerte an Gleichung (4.18) wird eine Dissoziationskonstante von  ${}^cK_{D,\tau} = 137 \pm 11 \text{ fM}$  ( $\chi^2 = 2.47$ ) erhalten. Grund für den relativ hohen Wert von  $\chi^2$  liegt in den großen Standardabweichungen der Messpunkte nahe des Wertes der Dissoziationskonstante  ${}^cK_{D,\tau}$ . Kleinste nur schwer zu kontrollierende Schwankungen, verursacht durch eventuelle Ungenauigkeiten beim Ansetzen der Probelösungen, resultieren in diesem Konzentrationsbereich sehr schnell in hohen Änderungen der mittleren Fluoreszenzlebensdauer und damit in großen Standardabweichungen.

Beim Vergleich der Ergebnisse der herkömmlichen Fluoreszenztitration mit denen der Lebensdauertitration (zusammengefasst in Tabelle 4-6) fällt auf, dass sich diese analog verhalten. Verwunderlich ist dieses Ergebnis allerdings kaum; so lässt sich mit Hilfe des Einsteinfaktors für die spontane Emission  $A_{21}$  doch im Idealfall direkt aus dem Fluoreszenzspektrum die (natürliche) Fluoreszenzlebensdauer berechnen (s Abschnitt 2.2.1 Gleichung (2.5)).

**Tabelle 4-6** Zusammenfassung der Ergebnisse der konventionellen Fluoreszenztitration und der Fluoreszenzlebensdauertitration

	Fluoreszenzspektren				Fluoreszenzlebensdauertitration			
	w/o $\text{NTA}^{3-}/\text{CuNTA}^{-}$ <sup>5</sup>		w/ $\text{NTA}^{3-}/\text{CuNTA}^{-}$		w/o $\text{NTA}^{3-}/\text{CuNTA}^{-}$		w/ $\text{NTA}^{3-}/\text{CuNTA}^{-}$	
	Ex.	Em.	Ex.	Em.	$A_{1/2}$	$\tau_{\text{Fl, amp}}$	$A_{1/2}$	$\tau_{\text{Fl, amp}}$
$c_{\text{KD}} / \text{fM}$	N.A. <sup>6</sup>	N.A.	140±13	105±18	N.A.	N.A.	223±27	137±11
$[\text{L}]^7 / \text{nM}$	10.85±0.74	10.89±0.75	-	-	304±16	305±13	-	-
$\chi^2$	1.10	1.75	1.37	2.52	1.22	2.80	1.43	2.47

Der Sensor verhält sich sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit eines Metallpuffersystems wie in Abschnitt 4.2.3.1 vorhergesagt. Die Betrachtung des Verhaltens des Sensors in Gegenwart des  $\text{NTA}^{3-}/\text{CuNTA}^{-}$  - Systems schafft außerdem eine gute Ausgangslage für eventuelle *in vivo* Untersuchungen, da normalerweise in Zellen die Konzentration von freien  $\text{Cu}^{2+}$  (bzw.  $\text{Cu}^{+}$ , da  $\text{Cu}^{2+}$  ein Produkt einer Fenton-ähnlichen Reaktion von  $\text{Cu}^{+}$  ist) stark von Kupferchaperonen kontrolliert und gepuffert ist.<sup>[44]</sup>

<sup>5</sup> Hier wurde nur das Experiment 2 aus Abschnitt 4.2.3.2 mit einer Sensorkonzentration von ca. 10 nM betrachtet.

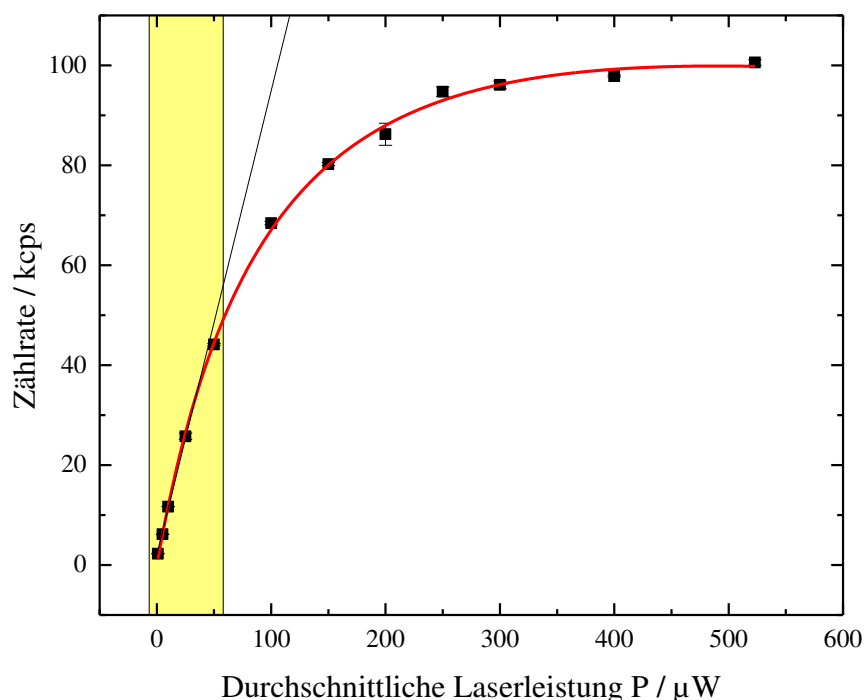
<sup>6</sup> N.A. bedeutet, dass das erhaltene Ergebnis physikalisch nicht sinnvoll ist, da das hier verwendete Modell versagt bzw. dass die angegebene Größe nicht in dem verwendeten Modell vorkommt.

<sup>7</sup> Der Übersichtlichkeit halber wurde DAHK-BDPY durch L substituiert.

### 4.2.5 FLCS Titrationsen *in vitro*

Wie in der Theorie zu FCS-Experimenten schon beschrieben, ist es notwendig von jedem Probenfarbstoff eine Sättigungskurve aufzunehmen um unerwünschte Verzerrungen des Anregungs- bzw. Detektionsvolumens, sowie den damit einhergehenden fehlerhaften Messergebnissen, zu vermeiden. Gregor *et al.* konnten in ausführlichen Berechnungen und Experimenten zeigen, dass insbesondere der Einsatz von gepulsten Lasern, aufgrund der hohen Peakintensitäten der Pulse, sehr schnell zu starken Sättigungseffekten führen.<sup>[201]</sup>

In Abbildung 4-29 ist die aufgenommene Sättigungskurve für den DAHK-BDPY Sensor zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass ab einer durchschnittlichen Laserleistung von  $P = 50 \mu\text{W}$  das System in die optische Sättigung übergeht. Um dies zu verhindern, wurde für die folgenden Experimente eine mittlere Laserleistung von  $P = 40 \mu\text{W}$  bei einer Repetitionsrate von  $f = 20 \text{ MHz}$  verwendet. Die oben schon beschriebene Kalibrierung des Experimentes erfolgte ebenfalls unter diesen Bedingungen.



**Abbildung 4-29** Optische Sättigungskurve einer 10nM Lösung des DAHK-BDPY Sensors in PBS-Puffer ( $pH = 7.4$ ;  $I = 154 \text{ mM NaCl}$ ) bei  $\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$  und  $f = 20 \text{ MHz}$ . Gelb hinterlegt ist der Bereich, in dem die Zählrate eine lineare Antwort auf die Erhöhung der durchschnittlichen Laserleistung zeigt.

Wie in der Einführung dieser Arbeit beschrieben soll mit Hilfe der FLCS die Quantifizierung des DAHK-BDPY-Cu-Komplexes sowie des *apo*-DAHK-BDPY gleichzeitig erfolgen. Dies kann nur in einem solchen System in hinreichender Weise erfolgen, in dem die Analytione gepuffert sind. Ein kurzes Gedankenexperiment soll diese Tatsache verdeutlichen<sup>8</sup>:

In einem typischen F(L)CS-Experiment beträgt die Konzentration des vorgelegten Sensors ca.  $[\text{DAHK-BDPY}] = 1 \text{ nM}$ . Das effektive Detektionsvolumen beträgt  $V_{\text{eff}} = 1 \text{ fL}$ , die Dissoziationskonstante beträgt  $^cK_D = 137 \text{ fM}$ . Durch Einsetzen dieser Werte in Gleichung (4.9) lässt sich der Anteil des DAHK-BDPY-Cu-Komplexes berechnen. Daraus lässt sich wiederum die durchschnittliche Teilchenzahl  $N$  im effektiven Volumen  $V_{\text{eff}}$  berechnen. Unter geeigneten Bedingungen können mit Hilfe der FLCS ACFs von Farbstoffen im pikomolaren Konzentrationsbereich aufgenommen werden. Bei Messungen in diesem Bereich treten normalerweise starke Artefakte durch einen großen Anteil von Raman- und Rayleigh-Streuung auf.<sup>[227]</sup> Angenommen der verwendete Aufbau ist in der Lage pikomolare Konzentrationsbereiche zu erfassen, so würde erst ab einer  $[\text{Cu}_{\text{ges}}^{2+}] = 100 \text{ pM}$  eine Detektion des DAHK-BDPY-Cu-Komplexes möglich. Die gemessene Teilchenanzahl im Detektionsvolumen würde für den freien Sensor  $N_L = 0.54$  und für den Komplex  $N_{\text{CuL}} = 0.06$  betragen. Da die Teilchen kein Kontinuum darstellen, sondern natürlich nur diskret durch das Volumen diffundieren, entspricht die detektierte Teilchenzahl einer Poisson-Verteilung mit ebendieser detektierten Teilchenzahl als Erwartungswert. Für den Komplex mit  $N_{\text{CuL}} = 0.06$  bedeutet dies, dass in einem Messzeitraum  $t_{\text{Mess}}$  nur zu 6 % der Zeit sich ein Komplexeilchen im Detektionsvolumen befindet. Zusammen mit der Tatsache, dass die Quantenausbeute des Komplexes nur 3% beträgt und das zeitgleich zu 42 % der Zeit der viel hellere freie Sensor im Detektionsvolumen ist, ist ersichtlich, dass die Messzeit für eine verlässliche Detektion beider Spezies in ungepufferten Systemen durch FLCS enorm ansteigen müsste, um genügend Photonen für die Gewichtung und Korrelation zu sammeln.

Aufgrund dieser Limitierung und der Tatsache, dass in den Systemen von Interesse (Zellen, extrazelluläre Räume) die freie Kupferkonzentration durch natürliche Kupferchape-

---

<sup>8</sup> Eine nähere Betrachtung der Berechnungen findet sich in Anhang A.4.

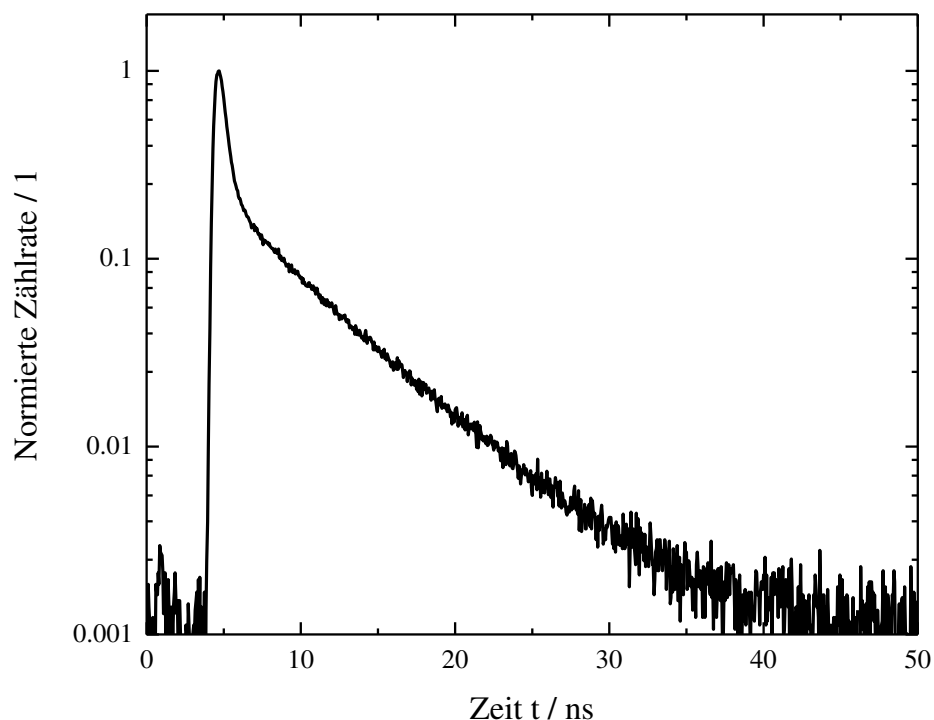
rone und Enzyme gepuffert ist, wird vor allem das gepufferte System behandelt. Die Betrachtung des ungepufferten System soll danach nur im kurzen Erfolgen und die im oben beschriebenen Gedankenexperiment auftretenden Limitierungen aufzeigen.

Bevor auf die Ergebnisse der FLCS-Messungen eingegangen wird, soll vorerst der Mess- bzw. Auswerteprozess anhand eines Messpunktes diskutiert werden. Zur Veranschaulichung wurde der Messpunkt mit einer  $pCu = 10.65$  ausgewählt, da hier die freie Kupferkonzentration hoch ist und sich ausreichend DAHK-BDPY-Cu-Komplex gebildet hat, um den FLCS-Prozess anschaulich darzustellen. Die Messungen wurden bei ca.  $[DAHK-BDPY] = 15 \text{ nM}$  in PBS-Puffer durchgeführt. Die Messungen wurden dreimal wiederholt, die Ergebnisse gemittelt und die zugehörigen Standardabweichungen bestimmt.

Mit Hilfe der FLCS soll nun sowohl die Konzentration der komplexierten DAHK-BDPY-Cu-Spezies als auch des freien *apo*-DAHK-BDPY bestimmt werden. Da sich beide Spezies nur in ihrer Lebensdauer unterscheiden, liefert die klassische Autokorrelation der Fluoreszenzfluktuationen die ACF (s. Abbildung 4-33 schwarze Kurve) einer Mischung beider Spezies mit einem scheinbaren  $G_{exp}(0) = 1.19$ , was einer Teilchenanzahl von  $N_{exp} = 0.84$  und einer Konzentration von  $c = 5.38 \text{ nM}$  (bei einem  $V_{eff} = 0.259 \text{ fL}$ ) entspricht. Die experimentell ermittelte Konzentration ist also schon deutlich geringer als die Gesamtkonzentration an Sensor. Der Grund dafür soll später erläutert werden.

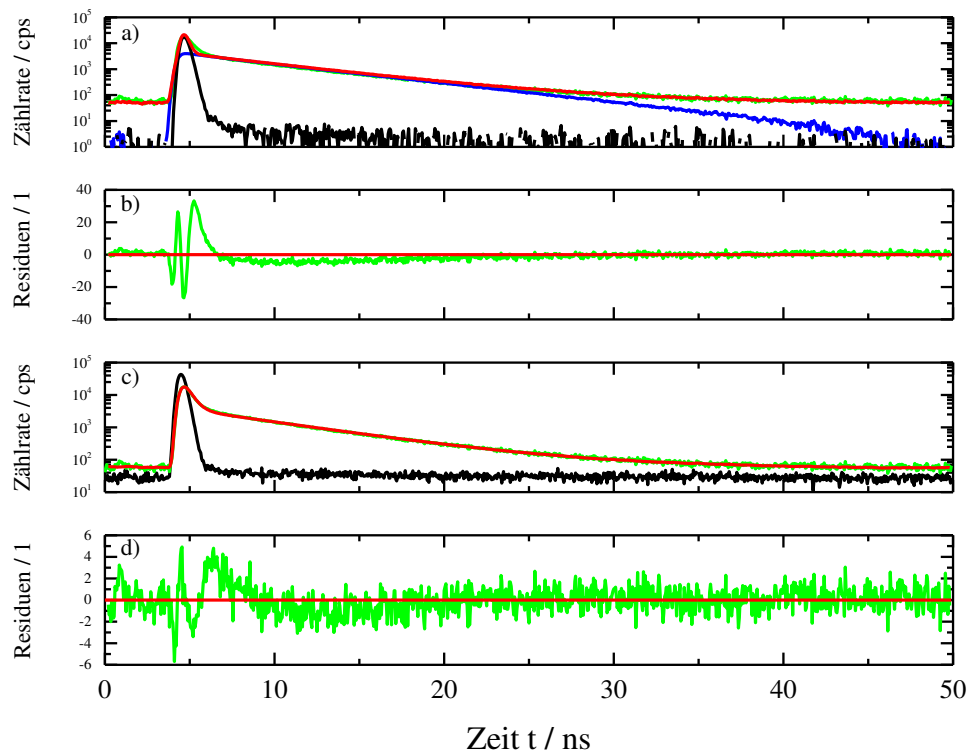
Da die Aufnahme der zu korrelierenden Fluoreszenzfluktuationen bei der FLCS, wie vorher schon erwähnt, im sogenannten TTTR oder t3- Modus erfolgt, wird neben einem Intensitätsverlauf auch ein TCSPC-Zerfall der Spezies aufgenommen. Dieser ist in Abbildung 4-30 dargestellt und zeigt ein deutlich biexponentielles Verhalten.





**Abbildung 4-30** Biexponentieller Fluoreszenzzerfall der Probe.

Der Zerfall enthält Informationen über beide Spezies. Um FLCS nutzen zu können, müssen die in Kapitel 2.4.2 eingeführten Filter  $f$  generiert werden. Dies kann auf zwei Arten geschehen. Zum einen kann der monoexponentielle Zerfall des *apo*-DAHK-BDPY als Muster zur Erzeugung der Filterwerte dienen, zum anderen kann der experimentell gewonnene Zerfall mit Hilfe eines biexponentiellen Rekonvolutionsfits angepasst werden. Beide Verfahren wurden für die vorhandene Probe angewendet und sind in Abbildung 4-31 dargestellt. Teil a) der Abbildung zeigt die Anpassung über das sog. Patternmatching, also dem anpassen der experimentell gewonnenen Zerfälle der einzelnen Spezies an den Fluoreszenzzerfall der Mischung der beiden Spezies. Schwarz dargestellt ist die IRF, grün der experimentell gewonnene Zerfall der Mischung und blau stellt den Fluoreszenzzerfall des *apo*-DAHK-BDPY dar. Die rote Kurve stellt den entsprechenden Fit dar. Bei der Betrachtung der in Teil b) dargestellten Residuen, fällt auf, dass es im Bereich unter 10 ns zu erheblichen Abweichungen vom Fit kommt. Das rührt daher, dass experimentell kein monoexponentieller Fluoreszenzzerfall der DAHK-BDPY-Cu-Komplex-Spezies gewonnen werden konnte. Selbst bei sehr hohen Kupferkonzentrationen existiert immer noch zu einem geringen Teil die frei *apo*-DAHK-BDPY-Spezies (s. Abbildung 4-23)

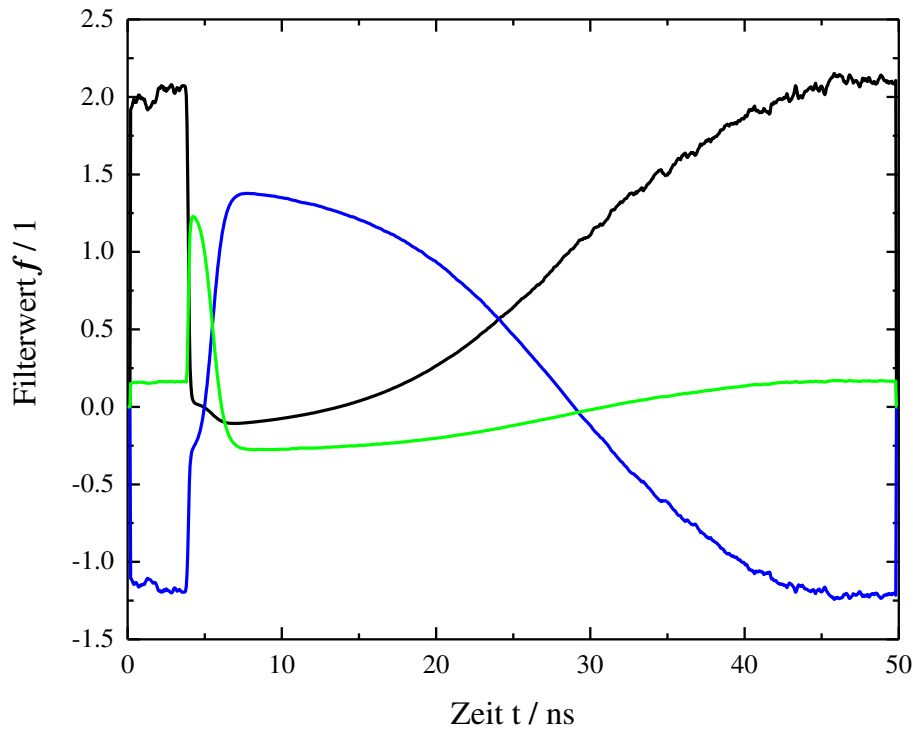


**Abbildung 4-31** Erzeugung der Filterfunktionen durch a) Patternmatching des separat gemessenen Fluoreszenzzerfalls der *apo*-Spezies c) Rekonvolutiionsanpassung an ein biexponentielles Modell mit den vorher separat bestimmten Fluoreszenzlebensdauern des Komplexes und des freien Sensors. Teil b) und d) zeigen die Residuen der jeweiligen Anpassungsmethoden.

Wird der experimentell gewonnene Fluoreszenzzerfall allerdings mit den vorher experimentell ermittelten Fluoreszenzlebensdauern der beiden Spezies in einem Rekonvolutiionsfit angepasst (Teil c)), zeigen die Residuen (Teil d)) geringere Abweichungen um den Mittelwert und die Anpassung beschreibt den ursprünglichen Zerfall hinreichend.

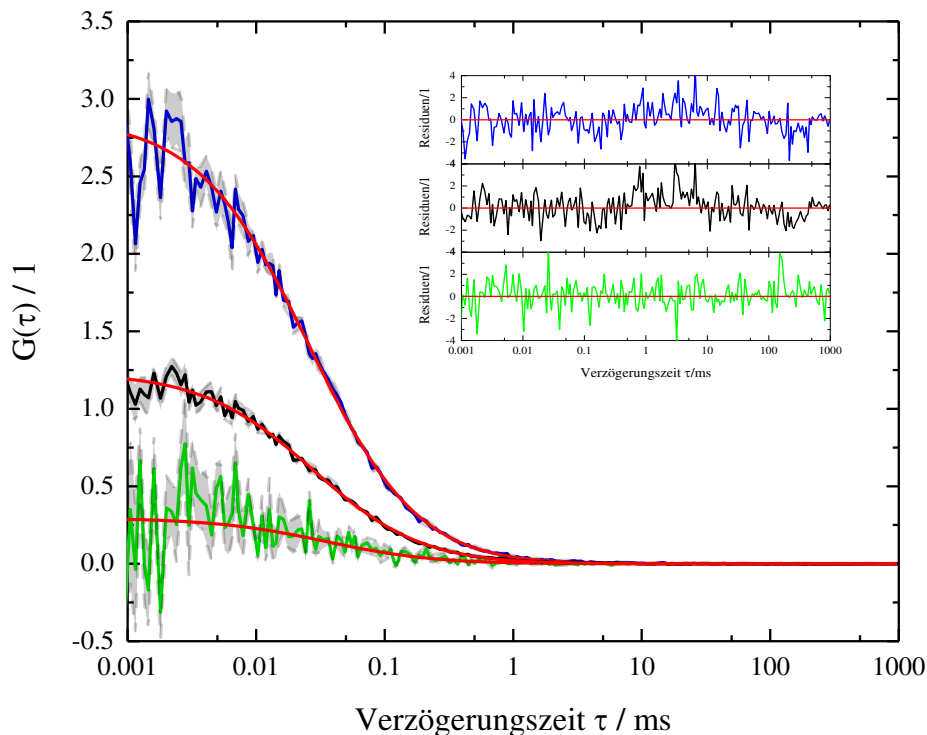
Da bei der Erzeugung der Filter bzw. der Autokorrelationsfunktionen es ausreichend ist, von  $n$ -Zerfällen nur  $n-1$ -Zerfälle zu kennen, können auch die Filterfunktionen aus dem Patternmatching in Teil a) erzeugt werden. In der Praxis hat sich aber gezeigt, dass die Erzeugung der Filter über den Rekonvolutiionsfit wesentlich weniger rechenintensiv und schneller von statten geht und anhand der Residuen hinreichend genau ist.

Auf die aus obiger Abbildung Teil c) erzeugten Zerfälle werden nun die in Kapitel 2.4.2 beschriebenen Funktionen (2.44) und (2.45) zur Erzeugung der Filterwerte  $f$  angewendet. Das Ergebnis dieser mathematischen Operationen ist in Abbildung 4-32 wiedergegeben.



**Abbildung 4-32** Die aus dem Rekonvolutionsfit erzeugten Filterfunktionen  $f$  für Untergrund- und Streulicht (schwarz), des freien DAHK-BDPY-Sensors (blau) sowie des Komplexes (grün).

Es werden drei verschiedene Filterfunktionen erhalten. Die schwarz dargestellte Funktion beschreibt Streu- und Untergrundlicht und hat daher ihre höchsten Werte bei extrem kurzen Zeiten (Streuung überwiegt) bzw. bei sehr langen Zeiten (der Untergrund und Rauschen überwiegt). Die blaue bzw. grüne Kurve ist mit dem Fluoreszenzzerfall des *apo*-DAHK-BDPY bzw. der Komplexspezies assoziiert. Nun können mit Hilfe von Gleichung (2.39) aus dem experimentell aufgenommenen Fluoreszenzintensitätsverlauf der Probe die Autokorrelationsfunktionen der einzelnen Spezies erzeugt werden.



**Abbildung 4-33** Die experimentell gemessene ACF der Probenlösung (schwarz) bei einer freien Kupferkonzentration von  $pCu = 10.65$ . Nach der Anwendung der oben gezeigten Filterfunktionen auf diese ACF werden die beiden spezies-spezifischen ACF für den freien Sensor (blau) und den Komplex (grün) erhalten. Grau dargestellt sind die jeweiligen Standardabweichungen. Die roten Geraden zeigen die Gemäß Gleichung (2.32) angepassten ACF (mit  $V_{eff} = 0.259$  fL und  $\kappa = 4.509$ ). Das Insert gibt die entsprechenden Residuen der Anpassungen wieder.

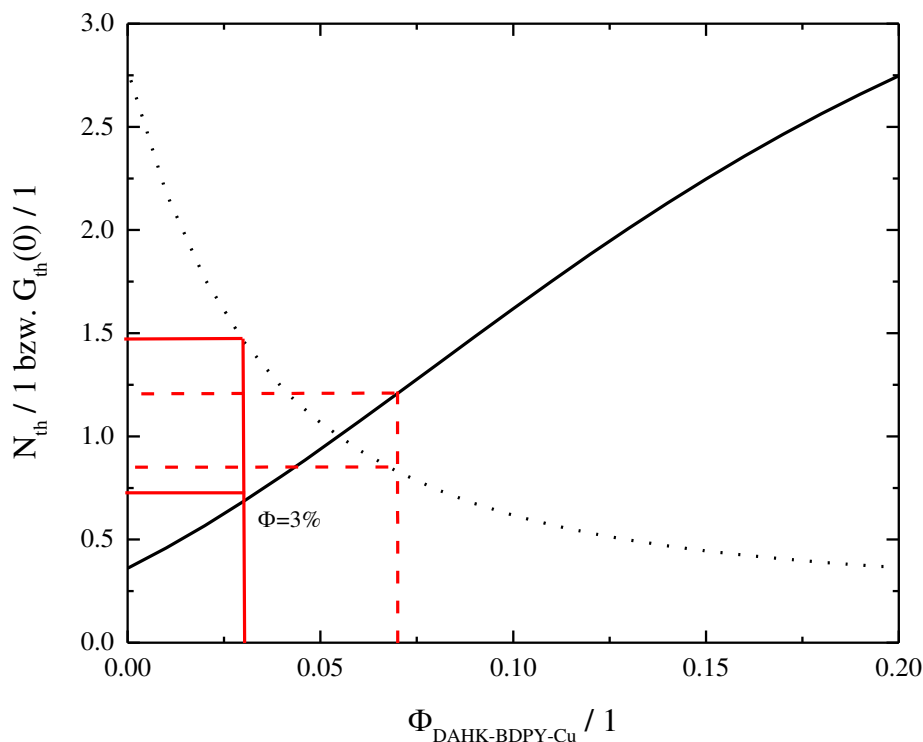
Obige Abbildung zeigt das Ergebnis der FLCS. Aus der ursprünglich aufgenommenen ACF (schwarz) wurden die beiden Spezies-spezifischen ACF für die *apo*-DAHK-BDPY-Spezies (blau) sowie für die Komplexspezies (grün) bestimmt.

An diesem Beispiel ist zudem gut der Einfluss der Quantenausbeuten der einzelnen Spezies auf die experimentell erhaltenen ACF zu erkennen. Würde der Einfluss der Quantenausbeuten keine Rolle spielen, müsste die ACF der Mischung eine geringere Amplitude als jede ACF der einzelnen Spezies besitzen, da die ACF der Mischung schließlich die Gesamtsumme aller Teilchen widerspiegelt. Im obigen Fall würde es bedeuten, dass die erwartete Amplitude

$$G_{erw}(0) = \frac{1}{N_{ges}} = \frac{1}{N_{blau}} + \frac{1}{N_{grün}} = \frac{1}{0.36} + \frac{1}{3.50} = \frac{1}{3.86} \quad (4.21)$$

$$= 0.26$$

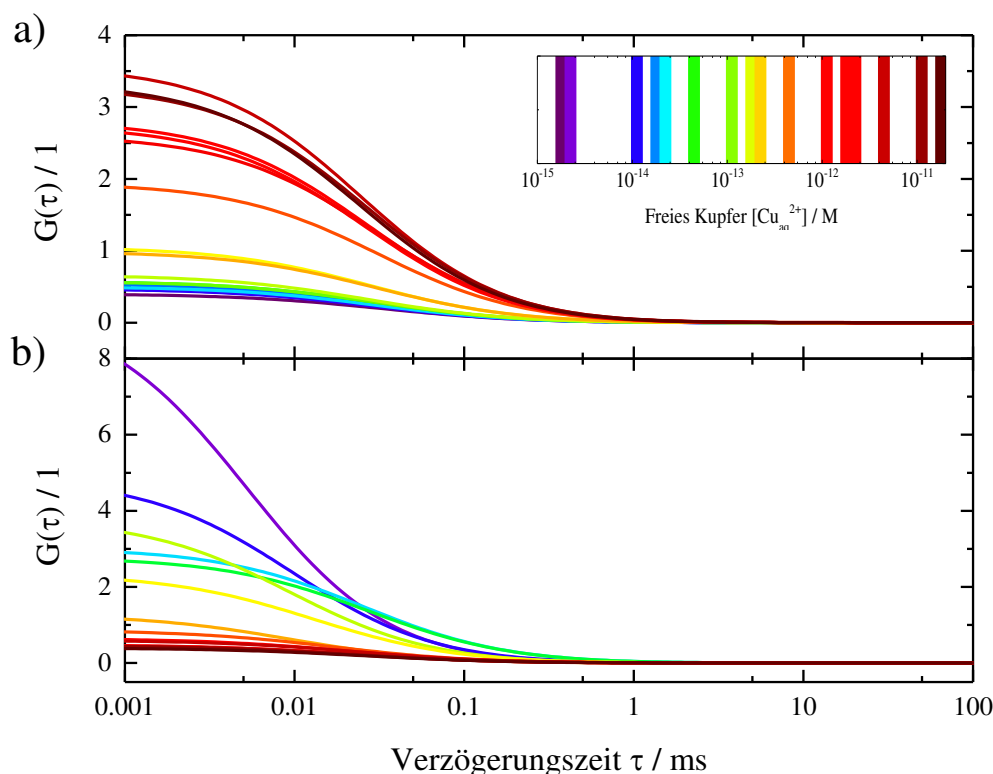
betragen sollte. Experimentell wird aber, wie bereits erwähnt,  $G_{exp}(0) = 1.19$  bzw.  $N_{exp} = 0.84$  erhalten. Ursache dieser Beobachtung ist die Tatsache, dass die Quantenausbeuten der einzelnen Spezies quadratisch in die Erzeugung der ACF eingehen; die genaue Abhängigkeit ist in Gleichung (2.38) gezeigt. Mit Hilfe der aus der FLCS erhaltenen Teilchenzahlen für die einzelnen speziesspezifischen ACF und der Quantenausbeuten kann Abbildung 4-34 berechnet werden.



**Abbildung 4-34** Abhängigkeit der Teilchenzahl  $N$  (schwarze durchgezogene Linie) bzw. der Amplitude der ACF  $G(0)$  (schwarze gestrichelte Linie) von der Fluoreszenzquantenausbeute des DAHK-BDPY-Cu-Komplexes bei einer gegebenen Teilchenzahl gemäß Gleichung (2.38). Die rote gestrichelten Geraden zeigen den oberen Wert der Standardabweichung der Quantenausbeute.

Es ist ersichtlich, dass bei einer Quantenausbeute für den DAHK-BDPY-Cu-Komplex von  $3 \pm 4 \%$  die errechnete theoretische Teilchenzahl  $N_{th} = 0.81 \pm 0.40$  bzw. Amplitude  $G_{th}(0) = 1.24 \pm 0.41$  sehr gut mit den experimentell bestimmten Ergebnissen übereinstimmt. Die Beobachtung, dass die aus den Teilchenanzahlen der ACFs ermittelte Quantenausbeute für den Komplex im Einklang mit den Ensembleexperimenten steht, bedeutet, dass mit der FLCS wirklich die Teilchen gemessen werden, die erwartet werden. Wäre dies nicht der Fall müsste es zu Abweichungen kommen und die Ergebnisse wären nicht so konsistent beim Vergleich der verschiedenen Methoden untereinander.

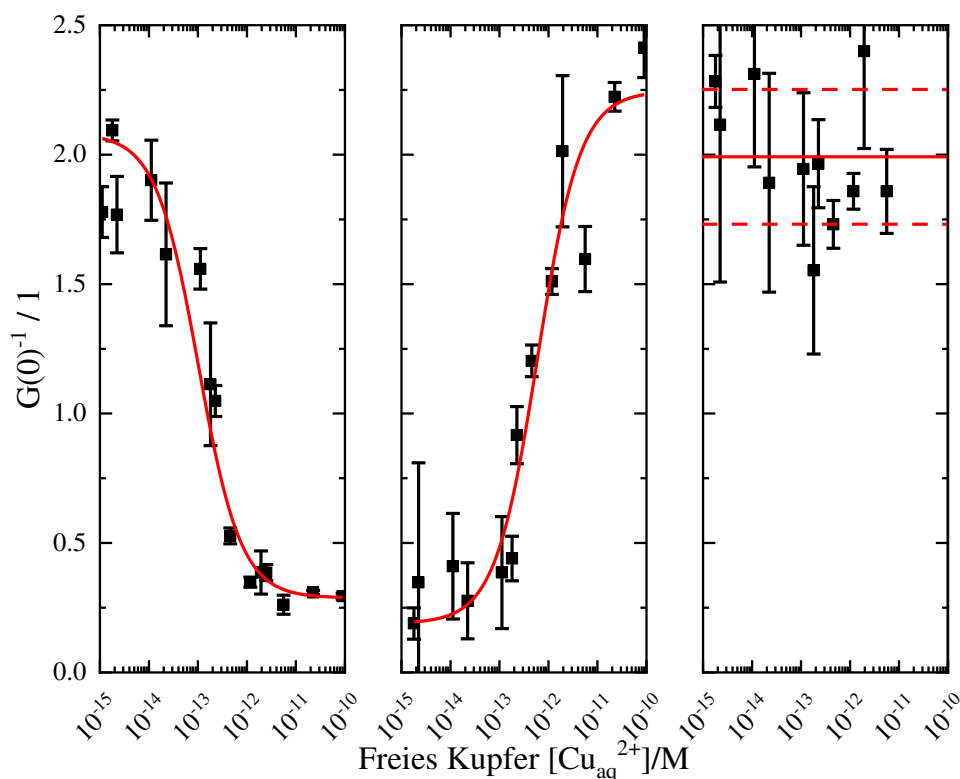
Oben beschriebener Vorgang wurde für steigende freie Kupfer-Konzentrationen durchgeführt und für jede erhaltene Mischungs-ACF die zugehörigen Filter per Rekonvolution des Fluoreszenzzerfalls erzeugt. So wurden für jeden Messpunkt drei ACF Funktionen erhalten: die Gesamt-ACF beider Spezies sowie die speziesspezifischen ACF des DAHK-BDPY-Cu-Komplexes und des *apo*-DAHK-BDPY. Die so erhaltenen speziesspezifischen ACF sind in Abbildung 4-35 wiedergegeben.



**Abbildung 4-35** Die mit Hilfe der FLCS gewonnenen speziesspezifischen ACF des freien Sensors a) sowie des Komplexes b) bei steigender freier Kupferkonzentration. Wie in dem Einsatz zu erkennen ist, nimmt die freie Kupferkonzentration von blau nach rot zu.

Die freie Kupferkonzentration nimmt in beiden Abbildungen vom blauen Teil des Farbspektrums hin zum roten Teil zu. In Teil a) ist die ACF der Spezies *apo*-DAHK-BDPY wiedergegeben. Ihre Amplitude steigt bei zunehmender freier Kupfer-Konzentration. Eine steigende Amplitude korrespondiert mit einer Verringerung der beobachteten Teilchenzahl im Detektionsvolumen, da sich bei steigender Kupferkonzentration mehr und mehr Komplexspezies ausbildet und der freie Sensor so verbraucht wird. Teil b) zeigt die ACF des DAHK-BDPY-Komplexes. Ausgehend von einer sehr hohen Amplitude, also

sehr geringer Teilchenzahl, nimmt diese bei Erhöhung der Kupfer-Konzentration ab. Dies korrespondiert mit einer Zunahme der Teilchenzahl im Detektionsvolumen.



**Abbildung 4-36** Titrationsverläufe der Teilchenzahlen des freien Sensors (links) und des Komplexes (mitte), sowie Darstellung der Gesamtteilchenzahl (rechts) im Detektionsvolumen.

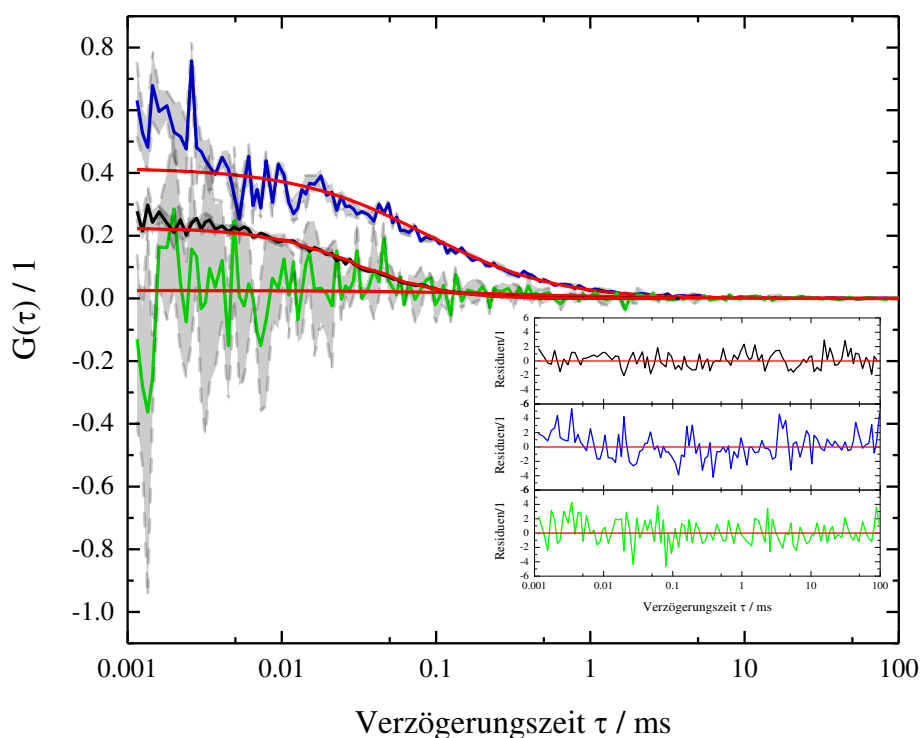
Werden die so gewonnenen Teilchenzahlen für den Komplex und *apo*-DAHK-BDPY gegen die freie Kupferkonzentration aufgetragen (s: Abbildung 4-36), wird das bereits aus den vorherigen Kapiteln bekannte Titrationsverhalten beobachtet. Der linke und mittlere Teil der Abbildung zeigt die abnehmende bzw. korrespondierende ansteigende Teilchenanzahl der *apo*-DAHK-BDPY bzw. komplexierten Spezies. Die rechte Seite der Abbildung stellt die Gesamtteilchenzahl, d.h. die Summe der Teilchenzahlen der einzelnen Spezies sowie deren Mittelwert (rote Gerade) und Standardabweichung (gestrichelte Gerade) mit  $N_{ges} = 1.99 \pm 0.26$  dar. Das Verhalten der einzelnen Teilchenspezies kann ebenso mit Gleichung (4.18) angepasst werden. Bei der Teilchenzahl handelt es sich um die mittlere Anzahl der Teilchen im betrachteten Beobachtungszeitraum. Dadurch kann die Teilchenzahl  $N$ , die durch die Autokorrelationsanalyse direkt aus dem eigentlichen Messsignal, nämlich dem zeitlichen Fluoreszenzintensitätsverlauf, abgeleitet wurde, als Größe für die Titration verwendet werden. Eine Anpassung der Teilchenzahlen mit Gleichung

(4.18) liefert daher die Dissoziationskonstanten  ${}^cK_D = 102 \pm 23$  fM ( $\chi^2 = 7.16$ ;  $\log {}^cK_D = 12.99 \pm 0.10$ ) für die Betrachtung der freien Spezies und  ${}^cK_D = 600 \pm 123$  fM ( $\chi^2 = 3.15$ ;  $\log {}^cK_D = 12.22 \pm 0.09$ ) für die komplexierte Spezies. Die Dissoziationskonstante, die mit Hilfe der freien Teilchenzahl bestimmt wurde, stimmt gut mit den zuvor durch andere Titrationstechniken bestimmten Dissoziationskonstanten überein. Die aus der Betrachtung der Komplexeilchenzahl gewonnene Dissoziationskonstante zeigt lediglich eine Abweichung um den Faktor fünf. Begründen lässt sich dies durch die fehlerbehafteten Ausgangsdaten. Das Problem bei der Erzeugung der ACF der komplexierten Spezies ist die Anzahl an Photonen, die von dieser Spezies stammen. Je geringer die Anzahl der Photonen, desto fehlerbehafteter die ACF und damit desto fehlerbehafteter die erhaltene Teilchenanzahl. Durch eine Verlängerung der Messzeit, Änderung der Anregungswellenlänge oder Laserleistung kann dieser Fehler weiter verringert werden.



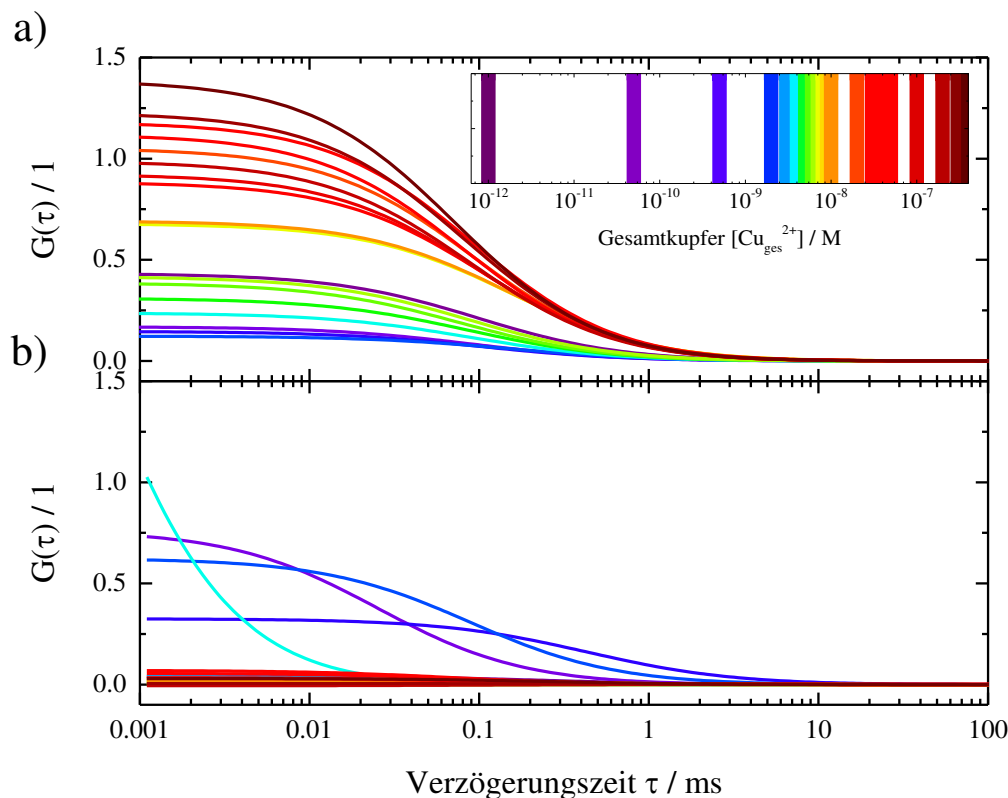
#### 4.2.5.1 Der ungepufferte Fall als Limitierung der Methode

In diesem Experiment wurde das System in Abwesenheit des Metallionenpuffers untersucht. Hierzu wurden die Messungen bei ca  $[\text{DAHK-BDPY}] = 5 \text{ nM}$  in PBS-Puffer durchgeführt. Alle Messungen wurden dreimal wiederholt, die Ergebnisse gemittelt und die zugehörigen Standardabweichungen bestimmt. Die experimentellen Bedingungen waren dieselben wie zuvor ( $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ ,  $f = 20 \text{ MHz}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 525 \pm 50 \text{ nm}$ ,  $P = 40 \mu\text{W}$ ). Die Zerfälle zur Erzeugung der Filterfunktionen, wurden wie zuvor beschrieben, über einen biexponentiellen Rekonvolutionsfit angepasst.



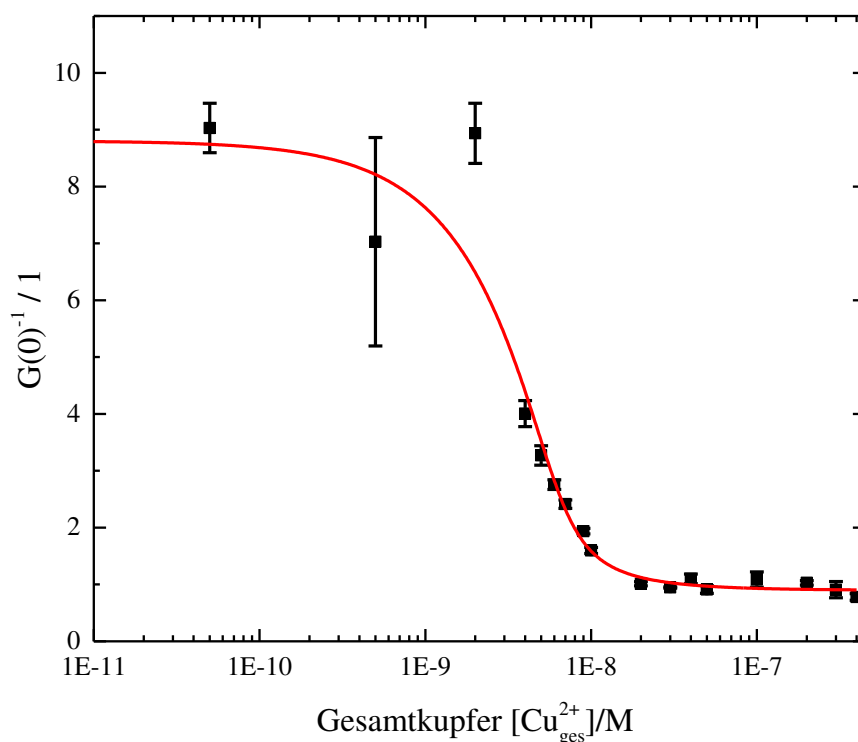
**Abbildung 4-37** Die experimentell gemessene ACF der Probenlösung (schwarz) bei einer Gesamtkupferkonzentration von  $[\text{Cu}_{\text{ges}}^{2+}] = 4 \text{ nM}$ . Nach der Anwendung der Filterfunktionen auf diese ACF werden die beiden speziesspezifischen ACF für den freien Sensor (blau) und den Komplex (grün) erhalten. Grau dargestellt sind die jeweiligen Standardabweichungen. Die roten Geraden zeigen die Gemäß Gleichung (2.32) angepassten ACF. Das Insert gibt die entsprechenden Residuen der Anpassungen wieder.

Auffällig ist der sehr große Fehler bei der ACF des Komplexes. Der Grund für diesen großen Fehler liegt in der geringen Anzahl Photonen die von dem Komplex stammen.



**Abbildung 4-38** Die mit Hilfe der FLCS gewonnenen speziesspezifischen ACF des freien Sensors a) sowie des Komplexes b) bei steigender Gesamtkupferkonzentration. Wie in dem Einsatz zu erkennen ist, nimmt die Gesamtkupferkonzentration von blau nach rot zu.

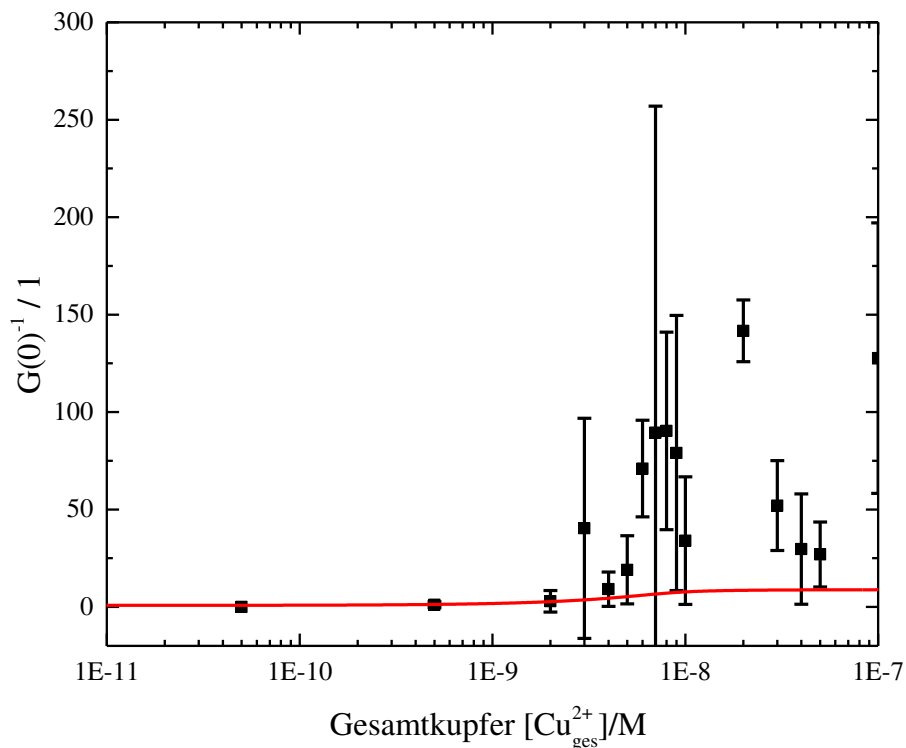
Abbildung 4-38 zeigt die Entwicklung der ACFs des freien Sensors (Teil a)) und des Komplexes (Teil b)) in Abhängigkeit der Gesamtkupferkonzentration. Eigentlich sollte die Amplitude  $G(0)$  der Komplex-ACF in Teil b) mit steigender Gesamtkupferkonzentration in gleichem Maße abnehmen wie die Amplitude der Sensor-ACFs in Teil a) zunimmt. Dies ist aber nicht der Fall und zeigt wie stark fehlerbehaftet die ACF des Komplexeilchens sind. Besser ist dieses Fehlverhalten zu erkennen, wenn die Teilchenzahl  $N = G(0)^{-1}$  gegen die Gesamtkupferkonzentration aufgetragen wird, wie in Abbildung 4-39 für den Fall des freien Sensors bzw. in Abbildung 4-40 für den Fall des Komplexes geschehen.



**Abbildung 4-39** Abnahme der mittleren Teilchenzahl im Detektionsvolumen in Abhängigkeit der Gesamtkupferkonzentration.

Im Falle des freien Sensors lassen sich die Datenpunkte gut ( $\chi^2 = 5.85$ ) mit Gleichung (4.12) anpassen und liefern, wie in den bereits zuvor diskutierten Fällen ungepufferter Systeme, die eingesetzte Sensorkonzentration von  $[\text{DAHK-BDPY}] = 6.00 \pm 0.8 \text{ nM}$ .

Die aus den ACFs des Komplexes gewonnenen Daten sind hingegen, wie vorher schon erwähnt, extrem fehlerbehaftet. In diesem Fall können die Daten nicht mit Gleichung (4.12) angepasst werden. Die rote Kurve in der Abbildung zeigt eine nach Gleichung (4.12) simulierte Kurve unter Zuhilfenahme der aus Abbildung 4-39 gewonnenen Parameter und soll den eigentlich erwarteten Kurvenverlauf darstellen.



**Abbildung 4-40** Zunahme der mittleren Teilchenzahl im Detektionsvolumen in Abhängigkeit der Gesamtkupferkonzentration. Die extrem großen Fehler zeigen, wie fehlerbehaftet die Ausgangsdaten und Korrelationsfunktionen waren.

Diese hohen Fehler zeigen gut die Grenzen der FLCS-Methode auf. Das Entscheidende für eine hohe Güte der Messergebnisse ist eine genügend hohe Anzahl an Photonen, welche zur Korrelation herangezogen werden. Farbstoffe mit geringer Quantenausbeute, wie der DAHK-BDPY-Cu-Komplex, liefern ohnehin nur eine geringe Anzahl von Photonen nach Anregung; dazu kommt, dass durch die Anwendung der Filterfunktionen sich die effektiv zur Korrelation zur Verfügung stehende Anzahl an Photonen noch weiter verringert. Dies führt dazu, dass die erzeugten ACFs entsprechend hohe Fehler aufweisen und nicht die erwarteten Ergebnisse liefern. Wie in Abschnitt 4.2.5 bereits beschrieben muss also die Anzahl der detektierten Photonen erhöht werden.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich prinzipiell in zwei Teile. Der erste Teil beschreibt Überlegungen zum Design und zur Synthese sowie spektroskopischen Charakterisierung eines fluoreszenten Sensors und seinen Eigenschaften. Es sollte sich um einen Sensor handeln, der Kupfer(II)-Ionen mit sehr hoher Affinität reversibel binden kann und die Energieniveaus des Kupfer(II)-Kations derart aufspaltet, dass eine möglichst starke *hypsochrome* Verschiebung stattfindet. Weiter sollte der Sensor eine funktionelle Gruppe besitzen, an die ein grün fluoreszierender Farbstoff mit langer Lebensdauer und hoher Quantenausbeute angebracht werden kann. Diese funktionelle Gruppe sollte jedoch nicht in die Komplexbildung von Sensor und Kupfer(II)-Kation eingreifen. Für die angedachten TCSPC und FLCS-Experimente war es wichtig, dass der Fluoreszenzlöschungsprozess bei Kupfer(II)-Bindung auf FRET und nicht auf den oft beschriebenen on-off-Prinzipien wie PET beruht. FRET liefert eine, wenn auch schwach fluoreszierende Komplexspezies mit einer unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauer. Diese Bedingungen führten dazu, dass das natürlich vorkommende Tetrapeptid DAHK des ATCUN-Typs und ein Tetramethylbodipyfarbstoff als gute Kandidaten identifiziert wurden. Die Synthese des DAHK-BDPY-Sensors war sehr geradlinig und bediente sich gängigen Methoden der Peptidsynthesechemie. Die strukturelle Charakterisierung des Sensors erfolgte durch standardmäßige 1D und 2D homo- sowie heteronukleare NMR Methoden und wurde durch eine extensive massenspektrometrische Charakterisierung und Fragmentierung bestätigt. Die spektroskopischen Eigenschaften, Absorptions- ( $\lambda = 495 \text{ nm}$  mit  $\epsilon = 85000 \pm 7820 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), Emissionsmaxima ( $\lambda = 507 \text{ nm}$ ), die Quantenausbeute ( $\Phi = 75 \pm 2 \%$ ) und die Fluoreszenzlebensdauer ( $\tau_{Fl} = 5.76 \pm 0.19 \text{ ns}$ ) unterscheiden sich nur geringfügig von denen des freien Tetramethylbodipyfarbstoffes und sind über einen großen *pH* Bereich (*pH* = 2-12) stabil.

Der dargestellte Sensor ist selektiv gegenüber Kupfer(II)-Kationen in Anwesenheit anderer Übergangsmetallkationen. Er ist allerdings auch in der Lage Nickel(II)-Kationen zu komplexieren. Dies kann allerdings vernachlässigt werden, da die Affinität gegenüber Kupfer(II)-Kationen ca. um den Faktor  $10^5$  größer ist. Der DAHK-BDPY Sensor bindet Kupfer(II)-Kationen in einer 1:1-Komplexstöchiometrie und bildet bei *pH* = 6.5-8 einen lilafarbenen Komplex mit einem Absorptionsmaximum von  $\lambda = 525 \text{ nm}$

( $\epsilon = 120 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen Bodipy-Emissionspektrum und Komplexabsorptionsspektrum bildet sich ein großes Überlappungsintegral aus und gemeinsam mit den geringen intramolekularen Abständen ( $R_0 = 22 \pm 1 \text{ \AA}$ ,  $r = 14.3 \pm 0.6 \text{ \AA}$ ) besitzt der Energietransfer eine hohe FRET-Effizienz ( $E_{\text{FRET}} = 93 \pm 0.2 \%$ ). Infolgedessen nehmen die Quantenausbeute und die Fluoreszenzlebensdauer des Komplexes um ca. 93 % auf  $\Phi = 3 \pm 4 \%$  bzw.  $\tau_{\text{Fl}} = 0.41 \pm 0.01 \text{ ns}$  ab.

Nach der Synthese und Charakterisierung des Sensors wurde im zweiten Teil das Massenwirkungsgesetz des Systems betrachtet. Aus diesem und den vorliegenden Messgrößen Fluoreszenzintensität  $I_{\text{Fl}}$ , mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{\text{av,amp}}$  und mittlere Teilchenanzahl  $N$ , wurden Formeln hergeleitet, die die Messgrößen mit der Gesamtanalytkonzentration in Beziehung setzen. Diese Betrachtungsweise hat allerdings den Nachteil, dass sie nur für Sensorkonzentrationen valide ist, die sich im Bereich der Dissoziationskonstante befinden. Bei Konzentrationen größer als die Dissoziationskonstante wird nur die Sensorkonzentration an sich bestimmt. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen ist es, einen Metallionenpuffer für das gewünschte Analyt einzusetzen. Dieser verhält sich analog zu einem klassischen *pH*-Puffer. Dadurch werden die *pM*-Werte der Lösung konstant gehalten, und der Sensor mit seiner extrem niedrigen Dissoziationskonstante greift nicht in das vorliegende Gleichgewicht ein. Dadurch können experimentelle Werte für die konditionelle Dissoziationskonstante des vorliegenden Sensors gewonnen werden. Als Metallionenpuffer wurde Nitrilotriessigsäure verwendet, da es einen 1:1-Komplex mit Kupfer(II)-Kationen bildet, eine hohe Bildungskonstante aufweist und aufgrund seiner Carboxylliganden das Ligandenfeld des Kupfer(II)-Kations nur gering aufspaltet. Das führt dazu, dass der gebildete  $\text{CuNTA}^-$ -Komplex weit im roten Spektralbereich absorbiert und es zu keinen Reabsorptionsprozessen der BODIPY-Emission kommt.

Für die eigentlichen Titrationsen wurden verschiedene experimentelle Methoden herangezogen und jeweils in Ab- und Anwesenheit des Metallionenpuffersystems durchgeführt. In den ersten Experimenten zur Kontrolle des prognostizierten Verhaltens des Sensors in Abwesenheit und Gegenwart des Metallionenpuffers wurden klassische Fluoreszenztitrationsen durchgeführt und die Fluoreszenzintensität der Anregungs- bzw. Emissionsmaxima in Abhängigkeit der Gesamtkupfer- bzw. der freien Kupferkonzentration aufgetragen. Das Aussehen und Verhalten der ermittelten Titrationskurven entsprach den Vorhersagen aus dem Massenwirkungsgesetz. Bei Abwesenheit des Metallionenpuffers wurden

die Werte der Dissoziationskonstanten vom Anpassungsalgorithmus auf einen Wert gesetzt, dessen Fehler größer als der Wert ist. Das wird vom Algorithmus wie eine 0 gewertet und die Terme aus Gleichung (4.9) verschwinden. Für die Sensorkonzentration liefert dieses Titrationsart allerdings die richtigen Werte.

In Gegenwart des Metallionenpuffers sieht diese Situation allerdings anders aus. Hier wird das Messsignal gegen die freie Kupfer(II)-Konzentration aufgetragen und es kann direkt durch Anpassung der Daten an Gleichung (4.18) die konditionelle Dissoziationskonstante bestimmt werden. Diese entsprach bei Betrachtung der Anregungsspektren  $\log^c K_{D,ex} = -12.85 \pm 0.04$  bzw. bei Betrachtung der Emissionsspektren  $\log^c K_{D,em} = -12.98 \pm 0.07$ .

Auf dem Weg zu FLCS-Titrationsen war der nächste Schritt die Betrachtung des Verhaltens der mittleren amplitudengewichteten Fluoreszenzlebensdauern in Bezug auf die Gesamtkupfer- und freie Kupferkonzentration. Eine Betrachtung der Fluoreszenzlebensdauern ist nicht nur wichtig, da diese bekannt sein müssen für spätere FLCS Messungen, sondern sie ist zudem eine robustere Messgröße als die Fluoreszenzintensität. Die Fluoreszenzintensität kann stark variieren, v.a. bei Messungen in zellulären Systemen. Hier können lokale Konzentrationsunterschiede zu unterschiedlichen Intensitäten führen, dies ist bei Betrachtung der Fluoreszenzlebensdauer nicht der Fall.

Prinzipiell lieferten auch die Betrachtung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer die gleichen Erkenntnisse wie die Betrachtung der Intensitäten. Bei Auftragung gegen die Gesamtkupferkonzentration versagt der Anpassungsalgorithmus und liefert unsinnige Werte für die Dissoziationskonstante sowie lediglich die eingesetzte Sensorkonzentration.

Im Metallionenpuffersystem kann wieder die Dissoziationskonstante bestimmt werden. Diese wurde sowohl durch Anpassung der mittleren Fluoreszenzlebensdauern als auch durch Anpassung der Amplituden des biexponentiellen Zerfalls an Gleichung (4.18) bestimmt. Erhalten wurden folgende Dissoziationskonstanten für die Betrachtung der Amplituden  $\log^c K_{D,amp} = -12.65 \pm 0.05$  und für die Betrachtung der mittleren Lebensdauern  $\log^c K_{D,\tau} = -12.86 \pm 0.04$ .

Final wurde das DAHK-BDPY-Cu-System mit Hilfe der FLCS untersucht. Zuerst wurde an einem beispielhaften Messpunkt die FLCS Technik durchgeführt und gezeigt, warum die experimentell gemessene Amplitude der Gesamt-ACF sich nicht additiv aus den ein-

zelenen speziesspezifischen ACF zusammensetzt. Vor diesem Hintergrund wurde vor allem das System in Anwesenheit eines Metallionenpuffers betrachtet. Grund dafür ist die geringe Wahrscheinlichkeit, im Falle der Abwesenheit eines Metallionenpuffers, Photonen des Kupferkomplexes zu detektieren und damit zu korrelieren. An jedem Messpunkt wurde aus der Gesamt-ACF die speziesspezifische ACF extrahiert und die daraus gewonnene mittlere Teilchenzahl gegen die freie Kupferkonzentration aufgetragen. Erneute Anpassung der Daten an Gleichung (4.18) lieferte bei Betrachtung der Abnahme des freien Liganden  $\log^c K_{D,apo} = -12.99 \pm 0.10$  und bei der Betrachtung der Zunahme der komplexierten Spezies  $\log^c K_{D,holo} = -12.22 \pm 0.09$ . Eine kurze Behandlung des ungepufferten Falls zeigte, wie schwierig es ist, in einem solchen Fall verlässliche Daten zu generieren.

Nachfolgende Tabelle stellt die aus den verschiedenen Experimenten bestimmten Werte für die Dissoziationskonstante des DAHK-BDPY-Cu-Komplexes sowie die bekannten Literaturwerte für den DAHK-Cu-Komplex dar.

**Tabelle 5-1** Zusammenfassung der ermittelten Dissoziationskonstanten und Vergleich der Literaturwerte.

	$\log^c K_D$	
<b>Fluoreszenzintensität <math>I_{ex}/I_{em}</math></b>	-12.85 $\pm$ 0.04	-12.98 $\pm$ 0.07
<b>Fluoreszenzlebensdauer <math>\tau_{FL,av}/A</math></b>	-12.86 $\pm$ 0.04	-12.65 $\pm$ 0.05
<b>FLCS <math>N_{apo}/N_{holo}</math></b>	-12.99 $\pm$ 0.10	-12.22 $\pm$ 0.09
<b>Literatur</b>	-13.6 <sup>[237]</sup>	-13.8 <sup>[90]</sup>

Die in dieser Arbeit bestimmten Werte für die Dissoziationskonstante unterscheiden sich von Experiment zu Experiment nur unerheblich. Allein die Werte bestimmt aus den Fluoreszenzlebensdaueramplituden und aus der Betrachtung der Komplexeilchenzahl  $N_{holo}$  zeigen eine höhere Abweichung hin zu größeren Dissoziationskonstanten. Grund sind vor allem die stark fehlerbehafteten Messdaten, vor allem im Falle der FLCS Messungen, wie dort schon diskutiert. Im Vergleich mit den Literaturwerten sind die bestimmten Werte um eine Größenordnung niedriger. Eine leichte Abweichung von den Literaturwerten ist nicht weiter verwunderlich. Bei den bekannten Literaturwerten handelt es sich schließlich um die unsubstituierte Variante des Kupfer(II)-Komplexes. Bei genauerer Betrachtung der Röntgenkristallstruktur des DAHK-Cu-Komplexes in Abbildung 2-34 fällt auf, dass der Angriffspunkt für die Anbringung des Bodipy-Farbstoffes distal oberhalb der quadratisch-planaren Ebene des Jahn-Teller-verzerrten Oktaeders steht. Trotz der eigentlich



großen Entfernung zum Metallzentrum kann eine Modifikation des Lysin-Stickstoffs einen Einfluss auf die Komplexstabilität und damit auf die Dissoziationskonstante haben.

Erste Untersuchungen und Experimente zum *in-vivo* Verhalten (s. Anhang A 3) in Hep G2-Kulturen zeigten jedoch noch einige Schwächen des vorgestellten Sensors auf.

## 6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde das Design und die Synthese eines kleinen auf einem Tetrapeptid basierenden Fluoreszenzensors für Kupfer(II)-Kationen beschrieben. Im Gegensatz zu den meisten literaturbeschriebenen Sensoren basiert die Signalgebung des Sensors auf einer partiellen Löschung der Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzlebensdauer durch einen FRET-Mechanismus. Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von FLCS die Dissoziationskonstante direkt auf Einzelmolekülebene bestimmt werden kann. Da durch die FLCS sowohl die Konzentration des freien unkomplexierten Sensors als auch des Metallionenkomplexes bestimmt werden kann, lässt sich also bei Kenntnis der Dissoziationskonstante direkt die zugehörige Analytkonzentration bestimmen.

Schwierigkeiten treten allerdings noch auf bei der Bestimmung der einzelnen Teilchenzahlen, da vor allem bei dem komplexierten Teilchen, aufgrund seiner geringen Quantenausbeute, nur eine geringe Anzahl von Photonen detektiert und korreliert werden können. Dies führt zu einem schlechten Signal-to-Noise-Verhältnis und somit zu großen Fehlern in den Messungen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie dieses S/N-Verhältnis verbessert werden kann. Zum einen kann die Messzeit oder die Anregungswellenlänge vergrößert werden, was zu einer höheren Photonendichte am Detektor und folglich zu einer besseren Statistik der Korrelationsanalyse führt. Ein weiterer, allerdings etwas komplexerer Schritt, ist der Einsatz eines anderen Farbstoffes. Bei der Verwendung eines Farbstoffes, der im Vergleich zum Tetramethylbodipy, bathochrom verschoben ist, könnte die FRET-Effizienz verringert werden. Dies führt dazu, dass der Sensor-Kupfer(II)-Komplex eine höhere Quantenausbeute besitzt und damit mehr Photonen im gleichen Messintervall emittiert. Ein roter Farbstoff ließe sich auch bei höheren Wellenlängen anregen, das würde dazu führen, dass Streueffekte, welche vor allem im blauen Spektralbereich auftreten, vermindert werden. Neben der Verringerung der Streueffekte, hätte der Einsatz eines rotverschobenen Farbstoffes noch weitere interessante Vorteile. So sind im allgemeinen die verwendeten Detektoren im gelb-roten-Spektralbereich empfindlicher.<sup>[173]</sup> Ein weiterer großer Vorteil würde sich bei der *in-vivo* Anwendung des Sensor-Moleküls ergeben. Anregungslicht im blauen Spektralbereich hat in *in-vivo* Messungen den Nachteil, dass es in der Regel starke Autofluoreszenz der Umgebung auslöst und nur eine geringe Eindringtiefe in die Proben hat. Der Einsatz eines Farbstoffes, der im grünen oder

sogar im gelben Spektralbereich absorbiert, würde die Autofluoreszenz minimieren und eine größere Eindringtiefe in biologische Proben bieten.<sup>[278]</sup>

Nach der Optimierung der spektralen Eigenschaften des Sensors wäre ein weiterer Schritt für zukünftige Projekte die Bereitstellung des Sensors für robuste *in-vivo* Messungen in Zellen und Körper-/ Gewebsflüssigkeiten. Gerade hier ist aufgrund der eingangs genannten Fragen eine genaue Bestimmung der Kupfer(II)-Pools sehr wichtig. Leider konnte der in dieser Arbeit vorgestellte Sensor nicht ausreichend in die Zellen eingebracht werden, oder diese waren nach Einbringung des Sensors nicht mehr vital.

Ursache dafür, dass der DAHK-BDPY-Sensor nicht die Zellmembran durchwandern kann, liegt höchstwahrscheinlich in seiner Ladung bei physiologischen pH-Werten. Die Zellmembran als doppelt Lipidmembran lässt geladene Teilchen nur mit Hilfe von aktiven Transportproteinen durch. Es muss also eine Möglichkeit gefunden werden, den DAHK-BDPY-Sensor in die Zelle einzuschleusen. Dafür sind verschiedene Szenarien denkbar. Oft werden Farbstoffe in Zellen eingebracht, indem die Zellmembran mit Hilfe von Tensiden<sup>[279]</sup> behandelt werden. Diese werden dadurch angegriffen und es bilden sich Kanäle in der Zellmembran aus, durch die der Farbstoff ins Innere der Zelle diffundieren kann. Eine weitere Möglichkeit könnte das Ausnutzen eines Transportvehikels sein. Ganz nach dem Vorbild der Viren oder Phagen in der Natur gibt es Transportsysteme, die Wirkstoffe – in diesem Fall der DAHK-BDPY-Sensor – in das Innere einer Zelle schleusen können. Dazu zählen u.a. Liposome<sup>[280]</sup>, diese sind selbst kleine Vesikel aus Doppellipidschichten gefüllt mit dem Wirkstoff, welche von der Zelle durch Endocytose aufgenommen werden können. Eine weitere Methode, um die Membrangängigkeit des Sensors zu erhöhen, wäre ein rein synthetischer Ansatz. So wäre es denkbar, die ladungstragenden Stellen des Sensors mit Gruppen zu versehen, die sich durch die in den Zellen befindlichen Enzyme spalten lassen.<sup>[281,282]</sup> So könnte man beispielsweise den C-Terminus und die Asparaginseitenkette des DAHK-Peptidrückgrates mit Ester-Gruppen modifizieren; diese wiederum können von den Esterasen in der Zelle abgespalten werden. Es existieren noch eine Vielzahl weiterer Methoden.<sup>[283–290]</sup>

Für manche Anwendungen könnte aber ein nicht-membrangängiger Sensor, wie der DAHK-BDPY-Sensor, nützlich sein. Eventuell könnte er genutzt werden, um freie Kupfer(II)-Pools im synaptischen Spalt zu beobachten.<sup>[61]</sup>

Auch wenn es also noch ein weiter Weg zum robusten Einsatz von FLCS zur Quantifizierung von Kupfer(II)-Konzentrationen *in-vivo* ist, so konnte doch in dieser Arbeit ein solider Grundstein werden und gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, m.H. der FLCS die beiden Sensor-Spezies nebeneinander in einer Messung zu quantifizieren und die gewünschten Ergebnisse zu liefern. Der in dieser Arbeit eingeführte Sensor bildet also einen guten Ansatzpunkt, um weitere Entwicklungen und Verbesserungen voranzutreiben.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Das Prinzip eines a) turn-on-Sensors und eines b) turn-off-Sensors (F-Fluorophor, L-Ligand, M-Metall)	3
Abbildung 1-2 Beispiel für einen $\text{Cu}^{2+}$ -turn-on-Sensor basierend auf reduktivem PET synthetisiert von Qi <i>et al.</i> <sup>[27]</sup> Nach der Komplexbildung des Kupfer(II)-Ions durch den Liganden wird der PET-Prozess unterdrückt und es kommt zur Aktivierung der Fluoreszenz des BODIPY-Fluorophors. Die Dissoziationskonstante des gebildeten Komplexes liegt bei $K_D = 18 \mu\text{M}$ ( $\log K_D = -4.74$ ).	4
Abbildung 1-3 Nach der Komplexbildung von Kupfer(II)-Ionen erlischt die Fluoreszenz des von Rosenthal <i>et al.</i> synthetisierten BOT1 Farbstoffes durch oxidativen PET. Die Dissoziationskonstante des $\text{Cu}^{\text{II}}$ [BOT1]-Komplexes beträgt $K_D = 3.0 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ( $\log K_D = -5.52 \pm 0.01$ ). Abbildung entnommen und modifiziert von Rosenthal <i>et al.</i> <sup>[33]</sup>	4
Abbildung 1-4 Mechanismen des a) reduktiven PET und des b) oxidativen PET	5
Abbildung 1-5 FRET-Mechanismus	6
Abbildung 2-1 Beispiele für kupferabhängige Proteine und Vorkommen derselben in den Domänen des Lebens. Entnommen aus der Arbeit von Festa und Thiele. <sup>[1]</sup>	11
Abbildung 2-2 Titration einer Wurzel von <i>Arabidopsis Thaliana</i> transfiziert mit dem His <sub>6</sub> -EGFP Sensor. Bei Steigerung der extrazellulären Kupferkonzentration nimmt die Fluoreszenzlebensdauer ab. Das Bild a) zeigt die Pflanze bei 50 nM $\text{Cu}^{2+}$ mit einer mittleren Lebensdauer von 1.9 ns, b) 50 $\mu\text{M}$ $\text{Cu}^{2+}$ und 1.6 ns sowie c) 0.1 M und 1.1 ns.	16
Abbildung 2-3 GCS-2 Sensor von Choi <i>et al.</i> Der Sensor bindet Kupfer(II)-Ionen an einem ATCUN-Motiv (eingekreiste Strukturformel) in Folge dessen die Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzlebensdauer des GCS-2 abnimmt. Der Prozess ist reversibel und die Fluoreszenz des Sensors kann bei Zugabe von EDTA wiederhergestellt werden. Entnommen aus Choi <i>et al.</i> <sup>[40]</sup>	17
Abbildung 2-4 TIRF Aufnahme von HeLa-Zellen, an deren Oberfläche ein GCS-2-Fusionsprotein sitzt und deren Reaktion auf die Zugabe von Kupfer(II)-Ionen und EDTA. Entnommen aus Choi <i>et al.</i> <sup>[40]</sup>	17
Abbildung 2-5 Funktionsweise des Rhodamin-Carboanhydrase Kupfer(II)-Sensors. Entnommen aus McCranor <i>et al.</i> <sup>[43]</sup>	18

Abbildung 2-6	Fluoreszenzintensitäts- (obere Reihe) und Fluoreszenzlebensdaueraufnahmen (untere Reihe) von PC-12 Zellen inkubiert mit dem <i>apo</i> -CA-Sensor und a) 70 nM b) 10 pM und c) 0.9 fM an Kupfer(II)-Kationen.	19
Abbildung 2-7	Struktur und Funktionsweise des CS1 und CS3 Kupfer(I)-Sensors.	19
Abbildung 2-8	Funktionsweise des Amt1-FRET-Sensors für Kupfer(I)-Kationen. Entnommen aus Wegner <i>et al.</i> <sup>[42]</sup>	20
Abbildung 2-9	Jablonski-Diagramm zur Darstellung aller Prozesse, die mit einer mit einer Änderung der elektronischen Energieniveaus eines Moleküls einhergehen.	22
Abbildung 2-10	Normierte Absorptions- (schwarz) und Emissionsspektren (rot) eines Perrylendiimid-Farbstoffes. Farblich dargestellt sind die verschiedenen vibronischen Übergänge bei der Absorption und Emission. Die Länge der Pfeile im Spektrum ist direkt proportional zur Wahrscheinlichkeit des Übergangs und damit zur Überlappung der Wellenfunktionen der einzelnen vibronischen Zustände.	25
Abbildung 2-11	Energetische Betrachtung des Lösemitteleinflusses (blau) auf einen Fluorophor (grün). Der Fluorophor absorbiert Photonen (a), durch Reorganisation der LM-Moleküle (b) wird der angeregte Zustand stabilisiert. Nach der strahlenden Rückkehr in den Grundzustand (c) kommt es zu einer weiteren Reorganisation (d) des LM.	26
Abbildung 2-12	Hypothetisches Beispiel eines Emissionsspektrums (rot), welches mit einem Absorptionsspektrum (schwarz) überlappt (grau). Mit Hilfe von Gleichung (2.10) kann daraus das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ berechnet werden.	27
Abbildung 2-13	Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Donor-Akzeptor-Abstand.	29
Abbildung 2-14	Beispiel für einen genetisch codierten FRET Indikator für die Detektion von Östrogenen. <sup>[130]</sup>	30
Abbildung 2-15	Die von Prenesti <i>et al.</i> ermittelten Koeffizienten zur Abschätzung des Absorptionsmaximums eines Peptidkomplexes.	31
Abbildung 2-16	Messprinzip des modernen TCSPC. Der Laserpuls (türkis) bildet das Start-Signal der Zeitmessung. Sobald das emittierte Photon (grün) am Detektor auftritt, wird die Zeitmessung gestoppt. Das Zeitintervall $\Delta t$ wird anschließend in einem Histogramm gespeichert. Die experimentellen Einstellungen werden so gewählt, dass pro Signalperiode maximal ein Photon registriert wird.	34
Abbildung 2-17	Die am Detektor auftreffenden Photonen werden als diskrete Werte in die entsprechenden Zeitkanäle gemäß ihrer Ankunftszeiten eingetragen. Daraus ergibt	

sich ein diskretes Histogramm (schwarze Balken, nicht alle Kanäle gezeigt) dessen Einhüllende der Faltung aus Anregungspuls und exponentiellem Zerfall des angeregten  $S_1$ -Zustandes entspricht. \_\_\_\_\_ 35

Abbildung 2-18 Experimenteller Fluoreszenzzerfall (schwarz), monoexponentieller Rekonvolutionsfit (rot) und ermittelte IRF (blau) einer 10 nM Rhodamin 110 Lösung (PBS  $pH = 7$ ). Gemessen bei  $\lambda_{ex} = 470$  nm,  $\lambda_{em} = 525 \pm 50$  nm, Repetitionsrate 20 MHz und einer durchschnittlichen Laserleistung von 20  $\mu W$ . Die berechnete Fluoreszenzlebensdauer beträgt  $\tau_{Fl} = 3.97 \pm 0.03$  ns ( $\chi^2 = 1.061$ ) \_\_\_\_\_ 36

Abbildung 2-19 Darstellung der experimentell gemessenen Zerfallsfunktion  $S(t)$  (rot). Diese ergibt sich aus der Faltung der  $IRF(t)$  (gaußähnlicher Puls, schwarze Punkte) mit dem theoretischen exponentiellen Zerfall  $I(t)$  (schwarz gestrichelt) des ersten elektronisch angeregten Singulettzustandes. \_\_\_\_\_ 38

Abbildung 2-20 Zustandekommen des klassischen Pile-Up-Effekts. Treffen pro Signalperiode mehr als ein Photon auf den Detektor wird nur das zeitlich zuerst auftreffende Photon (grün) registriert. Nachfolgende Photonen (grau) werden nicht mehr registriert. Dies führt zu einer Bevorzugung früher Photonen und damit zu einer Verschiebung zu kürzeren Abklingzeiten. \_\_\_\_\_ 41

Abbildung 2-21 Erzeugung der Autokorrelationsfunktion  $\psi\tau$  durch Anwendung von Gleichung (2.19) auf eine zeitlich fluktuierende Funktion  $f(t)$  zu den Zeitpunkten  $t$ ,  $t + \tau_1$  und  $t + \tau_2$ . \_\_\_\_\_ 43

Abbildung 2-22 Illustration des Anregungs- und Detektionsstrahlengangs in einem FCS-Experiment sowie des konfokalen Prinzips. \_\_\_\_\_ 46

Abbildung 2-23 Darstellung des räumlichen Intensitätsverlaufs des Anregungsvolumens gemäß Gleichung (2.20) eines 63x Wasser Objektiv mit einer  $NA = 1.2$ , einem Strahldurchmesser von  $l = 4.16$  mm (s. Abschnitt 3.1.2.2) und einer Laserwellenlänge von  $\lambda = 470$  nm. Die Ausmaße des Anregungsvolumens betragen  $r = 0.252$   $\mu m$  und  $z = 0.38$   $\mu m$ . \_\_\_\_\_ 48

Abbildung 2-24 Zeitlicher Intensitätsverlauf einer 0.1 nM Rhodamin 110 Probe. ( $\lambda_{ex} = 470$  nm;  $f = 20$  MHz;  $\lambda_{em} = 525 \pm 50$  nm;  $P_{av} = 50$   $\mu W$ ) \_\_\_\_\_ 49

Abbildung 2-25 Autokorrelationsfunktion, gewonnen aus dem zeitlichen Intensitätsverlauf aus Abbildung 2-24. \_\_\_\_\_ 51

Abbildung 2-26 Die Ergebnisse der numerischen Simulationen von Hess <i>et al.</i> <sup>[198]</sup> Die Simulationen zeigen den Intensitätsverlauf der <i>MDF</i> eines 1.2 NA Objektivs in axialer (u) und lateraler (v) Richtung. Zum Vergleich ist ein ideales Gaußvolumen gezeigt. _	55
Abbildung 2-27 Die Graphiken zeigen die Ergebnisse der numerischen Simulationen von Enderlein <i>et al.</i> <sup>[202]</sup> wie sich das Aussehen der <i>MDF</i> und damit die ACF verändert bei a) unterschiedlichen Brechungsindizes und b) unterschiedlicher Deckglasdicke. _____	56
Abbildung 2-28 ACF einer 0.1 nM Rhodamin 110 Probe ( $\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$ ; $f = 20 \text{ MHz}$ ; $\lambda_{em} = 525 \pm 50 \text{ nm}$ ; $P_{av} = 50 \text{ } \mu\text{W}$ ) ohne Afterpulsing (schwarz) und mit Afterpulsing (rot). 57	
Abbildung 2-29 Stammbaum der aus FCS entwickelten Korrelationstechniken. Entnommen aus Elliot L. Elson, 40 Years of FCS: How It All Began. <sup>[220]</sup> _____	58
Abbildung 2-30 Prinzip des TTTR Modus für die Aufnahme von FLCS Daten. Jedem Photon (grün) werden zwei Zeiten zugeordnet, zum einen die Mikrozeiten $\Delta t$ in Bezug auf den Laserpuls, zum andern die Makrozeiten $t$ in Bezug auf den Start des gesamten Experimentes. _____	60
Abbildung 2-31 Ein biexponentieller Zerfall (schwarz, schraffiert) kann als Linearkombination zweier monoexponentieller Zerfälle (Grün und Rot) beschrieben werden. _____	61
Abbildung 2-32 Darstellung zweier Filterfunktionen für die monoexponentiellen Zerfälle aus Abbildung 2-31. Rot bezeichnet den Filter $f_a$ für den Zerfall A und grün den Filter $f_b$ für Zerfall B. Photonen, die in den Zeitkanälen, markiert durch die Bereiche 1 und 2 registriert werden, haben eine höhere Wahrscheinlichkeit, zum Zerfall A bzw. B zu gehören. _____	63
Abbildung 2-33 Simulierte FLCS Kurven für das Signal S, dass sich aus den beiden fluoreszenten Spezies A und B ergibt. _____	64
Abbildung 2-34 Röntgenkristallstruktur des DAHK-Cu-Komplexes nach Hureau <i>et al.</i> <sup>[238]</sup> _____	69
Abbildung 2-35 Vorgeschlagene Struktur des BODIPY-DAHK-Cu-Komplexes und Weg der Energieübertragung durch FRET. _____	70
Abbildung 2-36 Vier potentielle Sondenmoleküle für Kupfer(II)-Kationen. _____	71
Abbildung 3-1 Schematischer Aufbau der Experimente. _____	74
Abbildung 3-2 Ermittelte IRF (schwarz) sowie Anpassung durch eine Gaußfunktion (rot) für die beiden Detektoren a) MPF-Series b) SPCM-AQR-14 _____	77



Abbildung 3-3 Bestimmung des Laserstrahldurchmessers mit Hilfe einer beweglichen Schneide. _____	79
Abbildung 3-4 Simulation des Anregungsvolumens erzeugt von einem Laser mit einer Wellenlänge $\lambda = 470$ nm, fokussiert durch ein Zeiss C-Apochromat 63x/1.2 NA Wasserimmersionsobjektiv. Teil a) zeigt das Laserintensitätsprofil in axialer Ausdehnung entlang der z-Achse, b) zeigt das Intensitätsprofil in der x,y-Ebene. Für die Berechnung wurde ein $\beta = 1.68$ angenommen. Die Simulationen wurden mit dem frei verfügbaren Programm PSFLab, entwickelt von Nasse und Wöhl, durchgeführt. <sup>[248]</sup> _____	80
Abbildung 3-5 Kalibrier-ACF einer ca. 1 nM Rhodamin 110 Lösung (schwarz) sowie die Anpassungskurve (rot). _____	81
Abbildung 4-1 Vorgeschlagenen Syntheseroute des Zielmoleküls DAHK-BDPY. ____	83
Abbildung 4-2 Synthese des Bodipy-Farbstoffes. _____	85
Abbildung 4-3 Synthese des Bodipy-Aktivesters. _____	85
Abbildung 4-4 Synthese des Zielmoleküls DAHK-BDPY. _____	86
Abbildung 4-5 Chromatogramm des aufgereinigten DAHK-BDPY. Die rote Spur gibt die UV-Detektion des DAD zwischen 200-600 nm wieder. Blau zeigt das Chromatogramm registriert durch das Massenspektrometer. Der rechte Einsatz zeigt das hochauflösende Massenspektrum des DAHK-BDPY-Zielmoleküls. Links sind die Struktur sowie die Hauptfragmente des DAHK-BDPY abgebildet. _____	90
Abbildung 4-6 Normiertes Absorptionsspektrum (schwarz) und Emissionsspektrum (rot, Anregungswellenlänge $\lambda_{max} = 470$ nm) des DAHK-BDPY-Sensors Gemessen in PBS-Puffer ( $pH = 7.413$ , $I = 154$ mM NaCl) _____	92
Abbildung 4-7 Monoexponentieller Zerfall der Fluoreszenz von DAHK-BDPY (schwarz), sowie IRF (rot) in PBS-Puffer ( $pH = 7.413$ , $I = 154$ mM NaCl). _____	93
Abbildung 4-8 Verhalten von DAHK-BDPY gegenüber Änderungen des pH-Wertes a) der durchschnittlichen Fluoreszenzlebensdauer b) der normierten Absorption (schwarz, $\lambda = 495$ nm) bzw. der normierten Fluoreszenzintensität (rot, $\lambda = 507$ nm). _____	94
Abbildung 4-9 Verhalten des DAHK-BDPY gegenüber verschiedener Kationen der Übergangsmetalle. Grau: DAHK-BDPY 1 eq und 10 eq des $M^{x+}$ -Kations in PBS-Puffer $pH = 7.413$ . Rot: DAHK-BDPY 1 eq und 10 eq des $M^{x+}$ -Kations in PBS-Puffer $pH = 7.413$ sowie zusätzlich 1 eq $Cu^{2+}$ . _____	96

Abbildung 4-10 Absorptionsspektrum des DAHK-Ni <sup>2+</sup> -Komplexes (schwarz) sowie Emissionsspektrum von DAHK-BDPY (rot).	98
Abbildung 4-11 Emissionsspektrum des Zielmoleküls (schwarz) in Gegenwart von einem Äquivalent Cu <sup>2+</sup> (blau) in PBS-Puffer ( <i>pH</i> = 7.413, <i>I</i> = 154 mM NaCl).	99
Abbildung 4-12 TCSPC-Histogramme des DAHK-BDPY (schwarz) in Anwesenheit von einem Equivalent Cu <sup>2+</sup> (blau) sowie der IRF(rot).	100
Abbildung 4-13 Das Emissionsspektrum des BODIPY-Farbstoffes (schwarz) liegt komplett innerhalb des Absorptionsspektrums (blau) des DAHK-Kupferkomplexes.	101
Abbildung 4-14 Verhalten der Fluoreszenzlebensdauer a) und Fluoreszenzintensität b) des DAHK-BDPY-Cu <sup>2+</sup> bei verschiedenen <i>pH</i> -Werten. Alle Messungen wurden bei einer Ionenstärke von <i>I</i> = 154mM NaCl bei RT durchgeführt. Zur Sicherstellung, dass keine konkurrierenden Komplexbildungen ablaufen, wurden bei der Messung die sog. Good's Buffer verwendet. <sup>[257,258]</sup>	103
Abbildung 4-15 Absorptionsspektren des DAHK-Kupfer(II)-Komplexes bei verschiedenen <i>pH</i> -Werten.	104
Abbildung 4-16 Job-Plot des DAHK-BDPY-Cu <sup>2+</sup> Komplexes.	105
Abbildung 4-17 Verhalten der Messgröße <i>X</i> gegenüber des steigenden Besetzungsgrades nach Gleichung (4.1). Für diese Reaktion wurde eine Komplexbildungskonstante von <i>K<sub>A</sub></i> = 10 M <sup>-1</sup> angenommen. In a) ist der Sättigungsverlauf dargestellt, aufgrund der hohen Gleichgewichtskonstante ist ein starker spontaner Anstieg bis zur Sättigung zu erkennen. Einen tieferen Einblick in den Titrationsverlauf bietet eine halblogarithmische Auftragung wie in b) dargestellt. Von Fall zu Fall bieten sich auch linearisierte Auftragsarten wie z.b. Scatchard <sup>[267]</sup> oder Lineweaver-Burk-Plots <sup>[268]</sup> und viele weitere an. <sup>[269,270]</sup>	107
Abbildung 4-18 Simulation der Abnahme der Messgröße <i>X</i> beschrieben durch Gleichung (4.12) bei konstanter Dissoziationskonstante <sup>c</sup> <i>K<sub>D</sub></i> = 26 fM und variierender Gesamtligandkonzentration [ <i>L<sub>ges</sub></i> ].	111
Abbildung 4-19 Simulation der Abnahme der Messgröße <i>X</i> beschrieben durch Gleichung (4.18) bei variierender <sup>c</sup> <i>K<sub>D</sub></i> .	114
Abbildung 4-20 Einfluss des Verhältnisses log ([NTA <sub>ges</sub> ]/[Cu <sup>2+</sup> <sub>ges</sub> ]) auf den pCu <sup>2+</sup> -Wert bei einer festen [NTA <sup>3-</sup> ] = 0.1mM Konzentration bei <i>pH</i> = 7.413 und <i>I</i> = 154 mM NaCl.	

Der Einsatz rechts unten zeigt das Absorptionsspektrum des CuNTA<sup>-</sup>-Komplexes mit einem  $\lambda_{max} = 659 \text{ nm}$  und einem Extinktionskoeffizienten<sup>[277]</sup>  $\epsilon_{659 \text{ nm}} = 38.4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . 115  
Abbildung 4-21 Abnahme des Anregungsspektrums a) ( $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$ ) und des Emissionsspektrums c) ( $\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$ ) bei sukzessiver Erhöhung der [Cu<sup>2+</sup><sub>ges</sub>]-Konzentration. In b) und d) sind die Anregungs- bzw. Emissionsmaxima gegen die Gesamtkupfer(II)-Konzentration aufgetragen bei zwei unterschiedlichen Ligandkonzentrationen. Die Konzentrationen betrugen im ersten, mit den schwarzen gefüllten Quadraten gekennzeichneten, Experiment  $1 \text{ }\mu\text{M}$  und im zweiten, mit den offenen Quadraten gekennzeichneten, Experiment  $10 \text{ nM}$ . Aufgetragen sind die Mittelwerte samt Standardabweichungen von je fünf Messdaten, welche mit Gleichung (4.12) angepasst sind. \_\_\_\_\_ 117

Abbildung 4-22 Abnahme des Anregungsspektrums a) ( $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$ ) und des Emissionsspektrums c) ( $\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$ ) bei Steigerung der [Cu<sup>2+</sup><sub>aq</sub>]-Konzentration kontrolliert mit dem Metallionenpuffersystem CuNTA<sup>-</sup>/NTA<sup>3-</sup>. In b) und d) sind die Anregungs- bzw. Emissionsmaxima gegen die freie Kupfer(II)-Konzentration aufgetragen. Aufgetragen sind die Mittelwerte samt Standardabweichungen von je fünf Messdaten, welche mit Gleichung (4.18) angepasst sind. \_\_\_\_\_ 119

Abbildung 4-23 Normierte Fluoreszenzerfälle des DAHK-BDPY-Cu-Systems bei steigender Gesamtkupferkonzentration. Die Analytkonzentration nimmt von der blauen zur dunkelroten Kurve hin zu. Die IRF des experimentellen Aufbaus ist in schwarz wiedergegeben. \_\_\_\_\_ 121

Abbildung 4-24 Auftragung der Amplituden  $A_{1/2}$  erhalten aus den biexponentiellen Anpassungen der experimentellen Fluoreszenzerfälle für *apo*-DAHK-BDPY (schwarze Quadrate) und DAHK-BDPY-Cu (offene Quadrate) sowie die Anpassung der Daten an Gleichung (4.12). \_\_\_\_\_ 122

Abbildung 4-25 Auftragung der amplitudengewichteten mittleren Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{Fl, amp}$  gegen die Gesamtkupferkonzentration sowie Anpassung der Daten an Gleichung (4.12). \_\_\_\_\_ 123

Abbildung 4-26 Normierte Fluoreszenzerfälle des DAHK-BDPY-Cu-Systems bei steigender freier Kupferkonzentration in Anwesenheit des Metallionenpuffers. Die Analytkonzentration nimmt von der blauen zur dunkelroten Kurve hin zu. Die IRF des experimentellen Aufbaus ist in schwarz wiedergegeben. \_\_\_\_\_ 124

- Abbildung 4-27 Die Lebensdaueramplituden des *apo*-DAHK-BDPY-Cu (schwarze Quadrate) und des DAHK-BDPY-Cu-Komplexes (weiße Quadrate) in Abhängigkeit der freien Kupfer(II)-Konzentration. \_\_\_\_\_ 125
- Abbildung 4-28 Abnahme der mittleren Fluoreszenzlebensdauer bei Zunahme der freien Kupfer(II)-Konzentration. \_\_\_\_\_ 126
- Abbildung 4-29 Optische Sättigungskurve einer 10nM Lösung des DAHK-BDPY Sensors in PBS-Puffer ( $pH = 7.4$ ;  $I = 154$  mM NaCl) bei  $\lambda_{ex} = 470$  nm und  $f = 20$  MHz. Gelb hinterlegt ist der Bereich, in dem die Zählrate eine lineare Antwort auf die Erhöhung der durchschnittlichen Laserleistung zeigt. \_\_\_\_\_ 128
- Abbildung 4-30 Biexponentieller Fluoreszenzzerfall der Probe. \_\_\_\_\_ 131
- Abbildung 4-31 Erzeugung der Filterfunktionen durch a) Patternmatching des separat gemessenen Fluoreszenzzerfalls der *apo*-Spezies c) Rekonvolutionsanpassung an ein biexponentielles Modell mit den vorher separat bestimmten Fluoreszenzlebensdauern des Komplexes und des freien Sensors. Teil b) und d) zeigen die Residuen der jeweiligen Anpassungsmethoden. \_\_\_\_\_ 132
- Abbildung 4-32 Die aus dem Rekonvolutionsfit erzeugten Filterfunktionen  $f$  für Untergrund- und Streulicht (schwarz), des freien DAHK-BDPY-Sensors (blau) sowie des Komplexes (grün). \_\_\_\_\_ 133
- Abbildung 4-33 Die experimentell gemessene ACF der Probenlösung (schwarz) bei einer freien Kupferkonzentration von  $pCu = 10.65$ . Nach der Anwendung der oben gezeigten Filterfunktionen auf diese ACF werden die beiden speziesspezifischen ACF für den freien Sensor (blau) und den Komplex (grün) erhalten. Grau dargestellt sind die jeweiligen Standardabweichungen. Die roten Geraden zeigen die Gemäß Gleichung (2.32) angepassten ACF (mit  $V_{eff} = 0.259$  fL und  $\kappa = 4.509$ ). Das Insert gibt die entsprechenden Residuen der Anpassungen wieder. \_\_\_\_\_ 134
- Abbildung 4-34 Abhängigkeit der Teilchenzahl  $N$  (schwarze durchgezogene Linie) bzw. der Amplitude der ACF  $G(0)$  (schwarze gestrichelte Linie) von der Fluoreszenzquantenausbeute des DAHK-BDPY-Cu-Komplexes bei einer gegebenen Teilchenzahl gemäß Gleichung (2.38). Die rote gestrichelten Geraden zeigen den oberen Wert der Standardabweichung der Quantenausbeute. \_\_\_\_\_ 135
- Abbildung 4-35 Die mit Hilfe der FLCS gewonnenen speziesspezifischen ACF des freien Sensors a) sowie des Komplexes b) bei steigender freier Kupferkonzentration. Wie in

dem Einsatz zu erkennen ist, nimmt die freie Kupferkonzentration von blau nach rot zu.

\_\_\_\_\_ 136

Abbildung 4-36 Titrationsverläufe der Teilchenzahlen des freien Sensors (links) und des Komplexes (mitte), sowie Darstellung der Gesamtteilchenzahl (rechts) im Detektionsvolumen. \_\_\_\_\_ 137

Abbildung 4-37 Die experimentell gemessene ACF der Probenlösung (schwarz) bei einer Gesamtkupferkonzentration von  $[\text{Cu}_{\text{ges}}^{2+}] = 4 \text{ nM}$ . Nach der Anwendung der Filterfunktionen auf diese ACF werden die beiden speziesspezifischen ACF für den freien Sensor (blau) und den Komplex (grün) erhalten. Grau dargestellt sind die jeweiligen Standardabweichungen. Die roten Geraden zeigen die Gemäß Gleichung (2.32) angepassten ACF. Das Insert gibt die entsprechenden Residuen der Anpassungen wieder.

\_\_\_\_\_ 139

Abbildung 4-38 Die mit Hilfe der FLCS gewonnenen speziesspezifischen ACF des freien Sensors a) sowie des Komplexes b) bei steigender Gesamtkupferkonzentration. Wie in dem Einsatz zu erkennen ist, nimmt die Gesamtkupferkonzentration von blau nach rot zu.

\_\_\_\_\_ 140

Abbildung 4-39 Abnahme der mittleren Teilchenzahl im Detektionsvolumen in Abhängigkeit der Gesamtkupferkonzentration. \_\_\_\_\_ 141

Abbildung 4-40 Zunahme der mittleren Teilchenzahl im Detektionsvolumen in Abhängigkeit der Gesamtkupferkonzentration. Die extrem großen Fehler zeigen, wie fehlerbehaftet die Ausgangsdaten und Korrelationsfunktionen waren. \_\_\_\_\_ 142

## 8 Literatur

- [1] R. a. Festa, D. J. Thiele, *Curr. Biol.* **2011**, *21*, R877–R883.
- [2] D. R. Rosen, A. C. Bowling, D. Patterson, T. B. Usdin, P. Sapp, E. Mezey, D. McKenna-Yasek, J. O'Regan, Z. Rahmani, R. J. Ferrante, et al., *Hum. Mol. Genet.* **1994**, *3*, 981–987.
- [3] C. S. Atwood, R. D. Moir, X. Huang, R. C. Scarpa, N. M. E. Bacarra, D. M. Romano, M. a Hartshorn, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12817–12826.
- [4] D. Strausak, J. F. B. Mercer, H. H. Dieter, W. Stremmel, G. Multhaup, *Brain Res. Bull.* **2001**, *55*, 175–185.
- [5] S. Lutsenko, K. Petrukhin, M. J. Cooper, C. T. Gilliam, J. H. Kaplan, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 18939–18944.
- [6] M.-C. Boll, M. Alcaraz-Zubeldia, S. Montes, C. Rios, *Neurochem. Res.* **2008**, *33*, 1717–1723.
- [7] C. Shen, E. J. New, *Metallomics* **2015**, *7*, 56–65.
- [8] D. J. Hare, E. J. New, M. D. de Jonge, G. McColl, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 5941–5958.
- [9] W. Chyan, D. Y. Zhang, S. J. Lippard, R. J. Radford, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 143–148.
- [10] H.-J. Lin, P. Herman, J. R. Lakowicz, *Cytometry* **2003**, *52A*, 77–89.
- [11] S. Wierer, S. Peter, K. Elgass, H. G. Mack, S. Bieker, A. J. Meixner, U. Zentgraf, F. Schleifenbaum, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 737–744.
- [12] B. Finkler, I. Riemann, M. Vester, A. Grüter, F. Stracke, G. Jung, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544–1557.
- [13] N. T. Urban, K. I. Willig, S. W. Hell, U. V. Nägerl, *Biophys. J.* **2011**, *101*, 1277–1284.

- [14] L. Meyer, D. Wildanger, R. Medda, A. Punge, S. O. Rizzoli, G. Donnert, S. W. Hell, *Small* **2008**, *4*, 1095–1100.
- [15] M. Wirtz, A. Grüter, P. Rebmann, T. Dier, D. A. Volmer, V. Huch, G. Jung, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12694–12697.
- [16] M. Wirtz, A. Grüter, F. Heib, V. Huch, J. Zapp, D.-P. Hertel, M. Schmitt, G. Jung, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 044001.
- [17] T. Cordes, S. A. Blum, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 993–999.
- [18] G. J. Schütz, G. Kada, V. P. Pastushenko, H. Schindler, *EMBO J.* **2000**, *19*, 892–901.
- [19] A. Kusumi, T. A. Tsunoyama, K. M. Hirose, R. S. Kasai, T. K. Fujiwara, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 524–532.
- [20] X. Shi, L. S. Teo, X. Pan, S. W. Chong, R. Kraut, V. Korzh, T. Wohland, *Dev. Dyn.* **2009**, *238*, 3156–3167.
- [21] M. J. M. Schaaf, W. J. A. Koopmans, T. Meckel, J. Van Noort, B. E. Snaar-Jagalska, T. S. Schmidt, H. P. Spaink, *Biophys. J.* **2009**, *97*, 1206–1214.
- [22] K. P. Carter, A. M. Young, A. E. Palmer, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4564–601.
- [23] V. Dujols, F. Ford, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7386–7387.
- [24] K. M. K. Swamy, S.-K. Ko, S. K. Kwon, H. N. Lee, C. Mao, J.-M. Kim, K.-H. Lee, J. Kim, I. Shin, J. Yoon, *Chem. Commun.* **2008**, 5915.
- [25] H. Y. Au-Yeung, C. Y. Chan, K. Y. Tong, Z. H. Yu, *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *177*, 300–312.
- [26] N. Boens, V. Leen, W. Dehaen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130–1172.
- [27] X. Qi, E. J. Jun, L. Xu, S. J. Kim, J. S. J. Hong, Y. J. Yoon, J. Yoon, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2881–2884.
- [28] A. T. Aron, K. M. Ramos-Torres, J. a. Cotruvo, C. J. Chang, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2434–2442.

- [29] W. Namkung, Y. Song, A. D. Mills, P. Padmawar, W. E. Finkbeiner, A. S. Verkman, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 15916–15926.
- [30] S. C. Dodani, Q. He, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18020–18021.
- [31] N. Basarić, M. Baruah, W. Qin, B. Metten, M. Smet, W. Dehaen, N. Boens, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2755.
- [32] X. Li, S. Qian, Q. He, B. Yang, J. Li, Y. Hu, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3627.
- [33] J. Rosenthal, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5536–5537.
- [34] B. Turfan, E. U. Akkaya, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2857–2859.
- [35] H. J. Kim, J. S. Kim, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7051–7055.
- [36] J. L. Vinkenborg, T. J. Nicolson, E. a Bellomo, M. S. Koay, G. a Rutter, M. Merckx, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 737–740.
- [37] B. Hötzer, R. Ivanov, T. Brumbarova, P. Bauer, G. Jung, *FEBS J.* **2012**, *279*, 410–419.
- [38] B. Hötzer, R. Ivanov, S. Altmeier, R. Kappl, G. Jung, *J. Fluoresc.* **2011**, *21*, 2143–2153.
- [39] S. E. Gordon, E. N. Senning, T. K. Aman, W. N. Zagotta, *J. Gen. Physiol.* **2016**, *147*, 189–200.
- [40] Y.-A. Choi, J. O. Keem, C. Y. Kim, H. R. Yoon, W. Do Heo, B. H. Chung, Y. Jung, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1301–1307.
- [41] E.-É. Bálint, J. Petres, M. Szabó, C.-K. Orbán, L. Szilágyi, B. Ábrahám, *J. Fluoresc.* **2013**, *23*, 273–281.
- [42] S. V Wegner, H. Arslan, M. Sunbul, J. Yin, C. He, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2567–2569.
- [43] B. J. McCranor, H. Szmecinski, H. H. Zeng, A. K. Stoddard, T. Hurst, C. a Fierke, J. R. Lakowicz, R. B. Thompson, *Metallomics* **2014**, *6*, 1034–1042.
- [44] T. D. Rae, P. J. Schmidt, R. a Pufahl, V. C. Culotta, T. V O'Halloran, *Science*



- 1999**, 284, 805–808.
- [45] Z. Xiao, J. Brose, S. Schimo, S. M. Ackland, S. La Fontaine, A. G. Wedd, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 11047–11055.
- [46] M. Rózga, M. Sokołowska, A. M. Protas, W. Bal, *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, 12, 913–918.
- [47] D. Kahra, M. Kovermann, P. Wittung-Stafshede, *Biophys. J.* **2016**, 110, 95–102.
- [48] S. J. Lippard, *Science (80-. )*. **1999**, 284, 748–749.
- [49] J. Ries, P. Schwille, *BioEssays* **2012**, 34, 361–368.
- [50] J. W. Krieger, A. P. Singh, C. S. Garbe, T. Wohland, J. Langowski, *Opt. Express* **2014**, 22, 2358–75.
- [51] S.-M. Guo, N. Bag, A. Mishra, T. Wohland, M. Bathe, *Biophys. J.* **2014**, 106, 190–200.
- [52] N. Bag, T. Wohland, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2014**, 65, 225–248.
- [53] P. Kapusta, R. Macháň, A. Benda, M. Hof, *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 12890–12910.
- [54] S. Felekyan, S. Kalinin, H. Sanabria, A. Valeri, C. A. M. Seidel, *ChemPhysChem* **2012**, 13, 1036–1053.
- [55] P. Kapusta, M. Wahl, A. Benda, M. Hof, J. Enderlein, *J. Fluoresc.* **2007**, 17, 43–48.
- [56] H. Laggner, M. Hermann, B. M. K. Gmeiner, S. Kapiotis, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 385, 959–961.
- [57] E. Gaggelli, H. Kozłowski, D. Valensin, G. Valensin, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 1995–2044.
- [58] D. W. Domaille, L. Zeng, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 1194–1195.
- [59] Y. Xiao, Q. Zhai, G. Wang, X. Liu, J. Zhao, F. Tian, H. Zhang, W. Chen, *RSC Adv.* **2016**, 6, 78445–78456.
- [60] F. Wang, P. Jiao, M. Qi, M. Frezza, Q. P. Dou, B. Yan, *Curr. Med. Chem.* **2010**,

- 17, 2685–98.
- [61] C. M. Ackerman, C. J. Chang, *J. Biol. Chem.* **2018**, 293, 4628–4635.
- [62] M. L. Turski, D. J. Thiele, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 717–721.
- [63] M. Schrag, C. Mueller, M. Zabel, A. Crofton, W. M. Kirsch, O. . Ghribi, R. Squitti, G. Perry, *Neurobiol. Dis.* **2013**, 59, 100–110.
- [64] R. Squitti, R. Polimanti, *Am. J. Neurodegener. Dis.* **2013**, 2, 46–56.
- [65] S. A. James, I. Volitakis, P. A. Adlard, J. A. Duce, C. L. Masters, R. A. Cherny, A. I. Bush, *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, 52, 298–302.
- [66] W. R. Yu, H. Jiang, J. Wang, J. X. Xie, *Neurosci. Bull.* **2008**, 24, 73–78.
- [67] W. A. Spencer, J. Jeyabalan, S. Kichambre, R. C. Gupta, *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, 50, 139–147.
- [68] E. Tokuda, Y. Furukawa, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 1–14.
- [69] J. L. Elliott, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2001**, 25, 1169–1185.
- [70] F. J. Gil-Bea, G. Aldanondo, H. Lasa-Fernández, A. López de Munain, A. Vallejo-Illarramendi, *Expert Rev. Mol. Med.* **2017**, 19, 1–14.
- [71] M. C. Boll, M. Alcaraz-Zubeldia, S. Montes, C. Rios, *Neurochem. Res.* **2008**, 33, 1717–1723.
- [72] K. J. Barnham, C. L. Masters, A. I. Bush, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 205–214.
- [73] M. Manto, *Toxics* **2014**, 2, 327–345.
- [74] R. M. Rasia, C. W. Bertoncini, D. Marsh, W. Hoyer, D. Cherny, M. Zweckstetter, C. Griesinger, T. M. Jovin, C. O. Fernandez, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, 102, 4294–4299.
- [75] J. F. B. Mercer, *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, 67, 1022–1028.
- [76] P. Milani, S. Gagliardi, E. Cova, C. Cereda, *Neurol. Res. Int.* **2011**, 2011, 1–9.
- [77] D. Horn, A. Barrientos, *IUBMB Life* **2008**, 60, 421–429.

- [78] V. Sharma, G. Enkavi, I. Vattulainen, T. Róg, M. Wikström, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 2040–2045.
- [79] L. Krishnamoorthy, J. A. Cotruvo, J. Chan, H. Kaluarachchi, A. Muchenditsi, V. S. Pendyala, S. Jia, A. T. Aron, C. M. Ackerman, M. N. Vander Wal, et al., *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 586–592.
- [80] C. J. Chang, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 744–747.
- [81] S. C. Dodani, D. W. Domaille, C. I. Nam, E. W. Miller, L. A. Finney, S. Vogt, C. J. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 5980–5985.
- [82] S. L. Stafford, N. J. Bokil, M. E. S. Achard, R. Kapetanovic, M. A. Schembri, A. G. McEwan, M. J. Sweet, *Biosci. Rep.* **2013**, *33*, 541–554.
- [83] C. White, J. Lee, T. Kambe, K. Fritsche, M. J. Petris, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 33949–33956.
- [84] M. L. Turski, D. C. Brady, H. J. Kim, B.-E. Kim, Y. Nose, C. M. Counter, D. R. Winge, D. J. Thiele, *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 1284–1295.
- [85] R. Dringen, I. F. Scheiber, J. F. B. Mercer, *Front. Aging Neurosci.* **2013**, *5*, 1–4.
- [86] D. Ramos, D. Mar, M. Ishida, R. Vargas, M. Gaite, A. Montgomery, M. C. Linder, *PLoS One* **2016**, *11*, e0149516.
- [87] P. C. Bull, G. R. Thomas, J. M. Rommens, J. R. Forbes, D. W. Cox, *Nat. Genet.* **1993**, *5*, 327–337.
- [88] H. J. Stuerenburg, *J. Neural Transm.* **2000**, *107*, 321–329.
- [89] M. Zhao, X.-F. Yang, S. He, L. Wang, *Sensors Actuators B Chem.* **2009**, *135*, 625–631.
- [90] T. R. Young, C. J. K. Wijekoon, B. Spyrou, P. S. Donnelly, A. G. Wedd, Z. Xiao, *Metallomics* **2015**, *7*, 567–578.
- [91] J. a. Cotruvo, Jr., A. T. Aron, K. M. Ramos-Torres, C. J. Chang, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4400–4414.
- [92] L. Huang, J. Zhang, X. Yu, Y. Ma, T. Huang, X. Shen, H. Qiu, X. He, S. Yin,

- Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *145*, 25–32.
- [93] S.-R. Liu, S.-P. Wu, *J. Fluoresc.* **2011**, *21*, 1599–605.
- [94] S.-P. Wu, S.-R. Liu, *Sensors Actuators B Chem.* **2009**, *141*, 187–191.
- [95] P. Comba, R. Krämer, A. Mokhir, K. Naing, E. Schatz, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, *2006*, 4442–4448.
- [96] Y. Zhong, J. Zhu, Q. Wang, Y. He, Y. Ge, C. Song, *Microchim. Acta* **2014**, *182*, 909–915.
- [97] C. Zong, K. Ai, G. Zhang, H. Li, L. Lu, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3126–3132.
- [98] J. Yao, K. Zhang, H. Zhu, F. Ma, M. Sun, H. Yu, J. Sun, S. Wang, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 6461–6468.
- [99] M. R. Hormozi-Nezhad, M. Taghipour, *Anal. Methods* **2015**, *7*, 5067–5073.
- [100] J. Yang, Z. L. Yuan, G. Q. Yu, S. L. He, Q. H. Hu, Q. Wu, B. Jiang, G. Wei, *J. Fluoresc.* **2016**, *26*, 43–51.
- [101] S.-P. Wu, Z.-M. Huang, S.-R. Liu, P. K. Chung, *J. Fluoresc.* **2012**, *22*, 253–259.
- [102] C. Yang, D. Gong, X. Wang, A. Iqbal, M. Deng, Y. Guo, X. Tang, W. Liu, W. Qin, *Sensors Actuators B Chem.* **2016**, *224*, 110–117.
- [103] B. Hötzer, T. Scheu, G. Jung, S. Castritius, *Opt. Eng.* **2013**, *52*, 053602-1-053602-8.
- [104] P. Li, X. Duan, Z. Chen, Y. Liu, T. Xie, L. Fang, X. Li, M. Yin, B. Tang, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7755–7757.
- [105] K. a. Price, J. L. Hickey, Z. Xiao, A. G. Wedd, S. a. James, J. R. Liddell, P. J. Crouch, A. R. White, P. S. Donnelly, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2748.
- [106] A. Jablonski, *Nature* **1933**, *131*, 839–840.
- [107] D. Wöhrle, M. W. Tausch, W.-D. Stohrer, *Photochemie: Konzepte, Methoden, Experimente*, Wiley-VCh, Weinheim, **1998**.
- [108] T. Rosenfeld, B. Honig, M. Ottolenghi, J. Hurley, T. G. Ebrey, *Pure Appl. Chem.*

- 1977**, 49, 341–351.
- [109] G. S. Hammond, J. Saltiel, A. A. Lamola, N. J. Turro, J. S. Bradshaw, D. O. Cowan, R. C. Counsell, V. Vogt, C. Dalton, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 3197–3217.
- [110] W. Fuß, C. Kosmidis, W. E. Schmid, S. A. Trushin, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, 43, 4178–4182.
- [111] A. F. Bell, D. Stoner-Ma, R. M. Wachter, P. J. Tonge, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6919–6926.
- [112] G. Jung, J. Wiehler, A. Zumbusch, *Biophys. J.* **2005**, 88, 1932–1947.
- [113] G. Jung, M. Werner, M. Schneider, *ChemPhysChem* **2008**, 9, 1867–1874.
- [114] E. Albert, *Phys. Zeitschrift* **1917**, 18, 121–128.
- [115] S. J. Strickler, R. A. Berg, *J. Chem. Phys.* **1962**, 37, 814–822.
- [116] H. Mustroph, S. Ernst, B. Senns, A. D. Towns, *Color. Technol.* **2015**, 131, 9–26.
- [117] G. Jung, S. Gerharz, A. Schmitt, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, 11, 1416–1426.
- [118] C. Spies, B. Finkler, N. Acar, G. Jung, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, 15, 19893–19905.
- [119] K. Baathulaa, Y. Xu, X. Qian, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2010**, 216, 24–34.
- [120] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, **2006**.
- [121] I. H. Stein, V. Schüller, P. Böhm, P. Tinnefeld, T. Liedl, *ChemPhysChem* **2011**, 12, 689–695.
- [122] B. Schuler, W. A. Eaton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, 18, 16–26.
- [123] A. K. Kenworthy, *Methods* **2001**, 24, 289–296.
- [124] F. Cremazy, E. Manders, P. Bastiaens, G. Kramer, G. Hager, E. Vanmunster, P. Verschure, T. Gadellajr, R. Vandriel, *Exp. Cell Res.* **2005**, 309, 390–396.

- [125] Y. Sei-Iida, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 59e–59.
- [126] K. L. Li, D. Rieck, R. J. Solaro, W. Dong, *Biophys. J.* **2014**, 107, 682–693.
- [127] J. Gravier, L. Sancey, S. Hirsjärvi, E. Rustique, C. Passirani, J. P. Benoît, J. L. Coll, I. Texier, *Mol. Pharm.* **2014**, 11, 3133–3144.
- [128] D. Llères, S. Swift, A. I. Lamond, in *Curr. Protoc. Cytom.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **2007**, pp. 1–19.
- [129] Y. Long, Y. Stahl, S. Weidtkamp-Peters, M. Postma, W. Zhou, J. Goedhart, M. I. Sánchez-Pérez, T. W. J. Gadella, R. Simon, B. Scheres, et al., *Nature* **2017**, 548, 97–102.
- [130] M. Awais, M. Sato, K. Sasaki, Y. Umezawa, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 2181–2186.
- [131] M. Mank, D. F. Reiff, N. Heim, M. W. Friedrich, A. Borst, O. Griesbeck, *Biophys. J.* **2006**, 90, 1790–1796.
- [132] J. Akerboom, T.-W. Chen, T. J. Wardill, L. Tian, J. S. Marvin, S. Mutlu, N. C. Calderon, F. Esposti, B. G. Borghuis, X. R. Sun, et al., *J. Neurosci.* **2012**, 32, 13819–13840.
- [133] K. Kikuchi, H. Takakusa, T. Nagano, *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2004**, 23, 407–415.
- [134] T. Li, Z. Yang, Y. Li, Z. Liu, G. Qi, B. Wang, *Dye. Pigment.* **2011**, 88, 103–108.
- [135] B. White, J. Holcombe, *Talanta* **2007**, 71, 2015–2020.
- [136] J. J. Ferrie, N. Ieda, C. M. Haney, C. R. Walters, I. Sungwienwong, J. Yoon, E. J. Petersson, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 11072–11075.
- [137] M. M. Lee, B. R. Peterson, *ACS Omega* **2016**, 1, 1266–1276.
- [138] L. M. S. Loura, M. Prieto, F. Fernandes, *Eur. Biophys. J.* **2010**, 39, 565–578.
- [139] Y. Nishida, S. Kida, *Coord. Chem. Rev.* **1979**, 27, 275–298.
- [140] R. Tsuchida, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1938**, 13, 388–400.
- [141] R. Tsuchida, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1938**, 13, 436–450.

- [142] H. Irving, R. J. P. Williams, *Nature* **1948**, *162*, 746–747.
- [143] E. Prenesti, P. G. Daniele, M. Prencipe, G. Ostacoli, *Polyhedron* **1999**, *18*, 3233–3241.
- [144] E. Gratton, M. Limkeman, *Biophys. J.* **1983**, *44*, 315–324.
- [145] G. I. Redford, R. M. Clegg, *J. Fluoresc.* **2005**, *15*, 805–815.
- [146] A. Esposito, H. C. Gerritsen, F. S. Wouters, *J. Opt. Soc. Am. A* **2007**, *24*, 3261–3273.
- [147] E. B. Van Munster, T. W. J. Gadella, *J. Microsc.* **2004**, *213*, 29–38.
- [148] M. Schwertner, M. J. Booth, T. Wilson, *J. Microsc.* **2005**, *217*, 184–187.
- [149] W. Becker, *The BH TCSPC Handbook*, Becker & Hickl GmbH, Berlin, **2010**.
- [150] K. M. Solntsev, D. Huppert, N. Agmon, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 3427–3430.
- [151] J. W. Petrich, M. C. Chang, D. B. McDonald, G. R. Fleming, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3824–3832.
- [152] A. Toukmaji, C. Sagui, J. Board, T. Darden, *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 10913–10927.
- [153] I. S. Nikolaev, P. Lodahl, A. F. Van Driel, A. F. Koenderink, W. L. Vos, *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **2007**, *75*, 1–5.
- [154] C. Rothe, S. I. Hintschich, A. P. Monkman, *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 2–5.
- [155] R. Swaminathan, N. Periasamy, *Proc. Indian Acad. Sci. - Chem. Sci.* **1996**, *108*, 39–49.
- [156] R. Luchowski, Z. Gryczynski, P. Sarkar, J. Borejdo, M. Szabelski, P. Kapusta, I. Gryczynski, *Rev. Sci. Instrum.* **2009**, *80*, 033109-1-033109-6.
- [157] M. Szabelski, R. Luchowski, Z. Gryczynski, P. Kapusta, U. Ortmann, I. Gryczynski, *Chem. Phys. Lett.* **2009**, *471*, 153–159.
- [158] R. Luchowski, S. Sabnis, M. Szabelski, P. Sarkar, S. Raut, Z. Gryczynski, J. Borejdo, P. Bojarski, I. Gryczynski, *J. Lumin.* **2010**, *130*, 2446–2451.

- [159] N. Boens, W. Qin, N. Basarić, J. Hofkens, M. Ameloot, J. Pouget, J.-P. Lefèvre, B. Valeur, E. Gratton, M. VandeVen, et al., *Anal. Chem.* **2007**, 79, 2137–2149.
- [160] R. Szlajak, K. Tutaj, W. Grudzinski, W. I. Gruszecki, R. Luchowski, *J. Nanoparticle Res.* **2013**, 15, 20–31.
- [161] R. Luchowski, P. Kapusta, M. Szabelski, P. Sarkar, J. Borejdo, Z. Gryczynski, I. Gryczynski, *Meas. Sci. Technol.* **2009**, 20, 095601.
- [162] M. Liu, M. Jia, H. Pan, L. Li, M. Chang, H. Ren, F. Argoul, S. Zhang, J. Xu, *Appl. Spectrosc.* **2014**, 68, 577–583.
- [163] T. Otsu, K. Ishii, T. Tahara, *Rev. Sci. Instrum.* **2013**, 84, 036105-1-036105-3.
- [164] K. Suhling, P. M. W. French, D. Phillips, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, 4, 13–22.
- [165] K. Suhling, *SPIE Newsroom* **2009**, 10–12.
- [166] K. Okabe, N. Inada, C. Gota, Y. Harada, T. Funatsu, S. Uchiyama, *Nat. Commun.* **2012**, 3, 705–709.
- [167] H. Van Manen, P. Verkuijlen, P. Wittendorp, V. Subramaniam, T. K. Van Den Berg, *Biophys. J.* **2008**, 94, L67–L69.
- [168] C. Jones, K. Suhling, *J. Phys. Conf. Ser.* **2006**, 45, 223–230.
- [169] R. R. Duncan, *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, 34, 679–682.
- [170] H. Gerritsen, R. Sanders, A. Draaijer, C. Ince, Y. Levine, *J. Fluoresc.* **1997**, 7, 11–15.
- [171] T. Salthammer, *J. Fluoresc.* **1992**, 2, 23–27.
- [172] F. Esposito, N. Spinelli, R. Velotta, V. Berardi, *Rev. Sci. Instrum.* **1991**, 62, 2822–2827.
- [173] P.-E. Optoelectronics, *Single Photon Counting Module Technical Data Sheet*, **2007**.
- [174] L. Turgeman, D. Fixler, *J. Biophotonics* **2014**, 7, 442–452.



- [175] A. J. Cross, G. R. Fleming, *Biophys. J.* **1984**, 46, 45–56.
- [176] G. Weber, *J. Chem. Phys.* **1977**, 66, 4081–4091.
- [177] R. D. Spencer, G. Weber, *J. Chem. Phys.* **1970**, 52, 1654–1663.
- [178] C. L. Nikias, J. M. Mendel, *IEEE Signal Process. Mag.* **1993**, 10, 10–37.
- [179] R. P. Heilbronner, *Tectonophysics* **1992**, 212, 351–370.
- [180] J. S. Lee, *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **1980**, 2, 165–168.
- [181] P. Schwille, Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Analyse Biochemischer Systeme Auf Einzelmolekülebene, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, **1996**.
- [182] R. Hanbury Brown, R. Q. Twiss, *Nature* **1956**, 178, 1046–1048.
- [183] G. Goldhaber, W. B. Fowler, S. Goldhaber, T. F. Hoang, T. E. Kalogeropoulos, W. M. Powell, *Phys. Rev. Lett.* **1959**, 3, 181–183.
- [184] G. Baym, *Acta Phys. Pol. B* **1998**, 29, 1839–1884.
- [185] S. W. Provencher, P. Štěpánek, *Part. Part. Syst. Charact.* **1996**, 13, 291–294.
- [186] D. Magde, E. Elson, W. W. Webb, *Phys. Rev. Lett.* **1972**, 29, 705–708.
- [187] E. L. Elson, D. Magde, *Biopolymers* **1974**, 13, 1–27.
- [188] D. Magde, E. Elson, *Biopolymers* **1974**, 13, 29–61.
- [189] R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren, P. Kask, *Eur. Biophys. J.* **1993**, 22, 169–175.
- [190] Z. Petrášek, P. Schwille, *Biophys. J.* **2008**, 94, 1437–1448.
- [191] J. Widengren, Ü. Mets, R. Rigler, *Chem. Phys.* **1999**, 171–186.
- [192] S. Wennmalm, L. Edman, R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 10641–10646.
- [193] J. Widengren, B. Terry, R. Rigler, *Chem. Phys.* **1999**, 249, 259–271.
- [194] J. Widengren, U. Mets, R. Rigler, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 13368–13379.
- [195] J. Widengren, P. Schwille, *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, 6416–6428.

- [196] H. Blom, A. Chmyrov, K. Hassler, L. M. Davis, J. Widengren, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 5554–5566.
- [197] S. Kim, K. Heinze, P. Schwille, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 963–973.
- [198] S. T. Hess, W. W. Webb, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 2300–2317.
- [199] O. Krichevsky, G. Bonnet, *Reports Prog. Phys.* **2002**, *65*, 251–297.
- [200] W. Zinth, U. Zinth, *Optik*, Oldenbourg Verlag München, München, **2011**.
- [201] I. Gregor, D. Patra, J. Enderlein, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 164–170.
- [202] J. Enderlein, I. Gregor, D. Patra, T. Dertinger, U. B. Kaupp, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 2324–2336.
- [203] A. Tcherniak, C. Reznik, S. Link, C. F. Landes, *Electronics* **2008**, *81*, 3–5.
- [204] D. Koppel, *Phys. Rev. A* **1974**, *10*, 1938–1945.
- [205] S. R. Aragón, R. Pecora, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 1791–1803.
- [206] U. Haupts, S. Maiti, P. Schwille, W. W. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 13573–13578.
- [207] L. Edman, U. Mets, R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 6710–6715.
- [208] M. Wachsmuth, W. Waldeck, J. Langowski, *J. Mol. Biol.* **2000**, *298*, 677–689.
- [209] U. Meseth, T. Wohland, R. Rigler, H. Vogel, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1619–1631.
- [210] J. Enderlein, I. Gregor, *Rev. Sci. Instrum.* **2005**, *76*, 033102-1-033102-5.
- [211] S. Veettil, N. Budisa, G. Jung, *Biophys. Chem.* **2008**, *136*, 38–43.
- [212] M. Vester, A. Grueter, B. Finkler, R. Becker, G. Jung, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 10281–10288.
- [213] Ü. Mets, J. Widengren, R. Rigler, *Chem. Phys.* **1997**, *218*, 191–198.
- [214] T. Dertinger, V. Pacheco, I. von der Hocht, R. Hartmann, I. Gregor, J. Enderlein, *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 433–443.
- [215] P. Schwille, U. Haupts, S. Maiti, W. W. Webb, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2251–2265.

- [216] N. O. Petersen, *Biophys. J.* **1986**, *49*, 809–815.
- [217] N. O. Petersen, D. C. Johnson, M. J. Schlesinger, *Biophys. J.* **1986**, *49*, 817–820.
- [218] M. A. Digman, E. Gratton, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2011**, *62*, 645–668.
- [219] V. Levi, Q. Ruan, K. Kis-Petikova, E. Gratton, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 997–1000.
- [220] E. L. Elson, in *Methods Enzymol.*, Elsevier Inc., **2013**, pp. 1–10.
- [221] I. Gregor, J. Enderlein, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6*, 13–8.
- [222] M. Böhmer, M. Wahl, *Chem. Phys.* **2002**, *353*, 439–445.
- [223] A. Benda, M. Hof, M. Wahl, M. Patting, R. Erdmann, P. Kapusta, *Rev. Sci. Instrum.* **2005**, *76*, 033106-1-033106-4.
- [224] R. Macháň, P. Kapusta, M. Hof, *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 4797–4813.
- [225] J. Humpolíčková, L. Beranová, M. Štěpánek, A. Benda, K. Procházka, M. Hof, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 16823–16829.
- [226] J. Enderlein, R. Erdmann, *Opt. Commun.* **1997**, *134*, 371–378.
- [227] S. Rüttinger, P. Kapusta, M. Patting, M. Wahl, R. Macdonald, *J. Fluoresc.* **2010**, *20*, 105–114.
- [228] S. Padilla-Parra, N. Audugé, M. Coppey-Moisán, M. Tramier, *Microsc. Res. Tech.* **2011**, *74*, 788–93.
- [229] J. Chen, J. Irudayaraj, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6415–6421.
- [230] J. M. Paredes, S. Casares, M. J. Ruedas-Rama, E. Fernandez, F. Castello, L. Varela, A. Orte, *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 9400–9418.
- [231] J. Humpolíčková, A. Benda, J. Sýkora, R. Macháň, T. Kral, B. Gasinska, J. Enderlein, M. Hof, *Biophys. J.* **2008**, *94*, L17–L19.
- [232] J. Humpolíčková, M. Štěpánek, T. Kral, A. Benda, K. Procházka, M. Hof, *J. Fluoresc.* **2008**, *18*, 679–684.
- [233] J. M. Paredes, L. Crovetto, A. Orte, J. M. Alvarez-Pez, E. M. Talavera, *Phys.*

- Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 1685–1694.
- [234] J. M. Paredes, A. Garzon, L. Crovetto, A. Orte, S. G. Lopez, J. M. Alvarez-Pez, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 5795–5800.
- [235] A. Ghosh, S. Isbaner, M. Veiga-Gutiérrez, I. Gregor, J. Enderlein, N. Karedla, *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 6022–6028.
- [236] E. T. Gum, R. a. Swanson, C. Alano, J. Liu, S. Hong, P. R. Weinstein, S. S. Panter, *Stroke* **2004**, *35*, 590–595.
- [237] A. Trapaidze, C. Hureau, W. Bal, M. Winterhalter, P. Faller, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17*, 37–47.
- [238] C. Hureau, H. Eury, R. Guillot, C. Bijani, S. Sayen, P.-L. Solari, E. Guillon, P. Faller, P. Dorlet, *Chem. - A Eur. J.* **2011**, *17*, 10151–10160.
- [239] D. Wang, J. Fan, X. Gao, B. Wang, S. Sun, X. Peng, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7675–7683.
- [240] A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932.
- [241] G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184–1201.
- [242] A. M. Huynh, J. Menges, M. Vester, T. Dier, V. Huch, D. A. Volmer, G. Jung, *ChemPhysChem* **2016**, *17*, 433–442.
- [243] B. Hinkeldey, A. Schmitt, G. Jung, *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 2019–2027.
- [244] M. Brellier, G. Duportail, R. Baati, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1269–1272.
- [245] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [246] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176–2179.
- [247] K. Suzuki, A. Kobayashi, S. Kaneko, K. Takehira, T. Yoshihara, H. Ishida, Y. Shiina, S. Oishi, S. Tobita, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 9850–9860.
- [248] M. J. Nasse, J. C. Woehl, *J. Opt. Soc. Am. A* **2010**, *27*, 295–302.
- [249] J. Eichler, B. Eppich, L. Dünkel, *Laser J.* **2004**, *8*, 63–66.

- [250] P.-O. Gendron, F. Avaltroni, K. J. Wilkinson, *J. Fluoresc.* **2008**, *18*, 1093–101.
- [251] V. Buschmann, B. Krämer, F. Koberling, R. Macdonald, S. Rüttinger, *Picoquant Appl. note Quant. FCS* **2007**, 1–8.
- [252] T. W. Green, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, **2006**.
- [253] M. Tera, K. Iida, K. Ikebukuro, H. Seimiya, K. Shin-ya, K. Nagasawa, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2749–2755.
- [254] Y. Qi, T. Geib, A. M. Huynh, G. Jung, D. A. Volmer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2015**, *29*, 885–890.
- [255] W. Bal, M. Sokołowska, E. Kurowska, P. Faller, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2013**, *1830*, 5444–5455.
- [256] M. Sokolowska, A. Krezel, M. Dyba, Z. Szewczuk, W. Bal, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 1323–1331.
- [257] N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa, R. M. M. Singh, *Biochemistry* **1966**, *5*, 467–477.
- [258] Q. Yu, A. Kandegedara, Y. Xu, D. B. Rorabacher, *Anal. Biochem.* **1997**, *253*, 50–56.
- [259] E. J. Olson, P. Bühlmann, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 830–830.
- [260] J. M. Edmond, *Deep. Res. Oceanogr. Abstr.* **1970**, *17*, 737–750.
- [261] N. V. Klassen, D. Marchington, H. C. E. McGowan, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2921–2925.
- [262] Z. Qiang, C. Adams, *Water Res.* **2004**, *38*, 2874–2890.
- [263] J. J. Christensen, J. Ruckman, D. J. Eatough, R. M. Izatt, *Thermochim. Acta* **1972**, *3*, 203–218.
- [264] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, L. N. Lin, *Anal. Biochem.* **1989**, *179*, 131–137.

- [265] J. P. E. Grolier, J. M. Del Río, *J. Chem. Thermodyn.* **2012**, *55*, 193–202.
- [266] A. A. Saboury, *J. Iran. Chem. Soc.* **2006**, *3*, 1–21.
- [267] G. Scatchard, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1949**, *51*, 660–672.
- [268] H. Lineweaver, D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 658–666.
- [269] W. R. Greco, M. T. Hakala, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 12104–12109.
- [270] J. E. Dowd, D. S. Riggs, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 863–869.
- [271] H. M. Irving, M. G. Miles, L. D. Pettit, *Anal. Chim. Acta* **1967**, *38*, 475–488.
- [272] J. H. Hildebrand, H. A. Benesi, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2703–2707.
- [273] D. K. Ryan, J. H. Weber, *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 986–990.
- [274] R. S. Macomber, *J. Chem. Educ.* **1992**, *69*, 375–378.
- [275] G. Schwarzenbach, *Complexometric Titrations*, Interscience Publisher, New York, **1957**.
- [276] D. D. Perrin, B. Dempsey, *Buffers for PH and Metal Ion Control*, Springer Netherlands, Dordrecht, **1979**.
- [277] A. Bermejo-Barrera, M. Guisasola-Escudero, F. Bermejo-Martinez, *Microchem. J.* **1986**, *33*, 52–61.
- [278] M. D. Heagy, in *Chemosensors*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **2011**, pp. 253–273.
- [279] G. E. Flaten, K. Luthman, T. Vasskog, M. Brandl, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *34*, 173–180.
- [280] V. Torchilin, *Drug Discov. Today. Technol.* **2008**, *5*, 95–103.
- [281] B. Finkler, C. Spies, M. Vester, F. Walte, K. Omlor, I. Riemann, M. Zimmer, F. Stracke, M. Gerhards, G. Jung, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548–562.
- [282] J. Han, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2009**, *110*, 2709–2728.
- [283] N. J. Yang, M. J. Hinner, *Methods Mol. Biol.* **2015**, 29–53.

- [284] P. L. McNeil, R. F. Murphy, F. Lanni, D. L. Taylor, *J. Cell Biol.* **1984**, 98, 1556–1564.
- [285] J. Han, A. Loudet, R. Barhoumi, R. C. Burghardt, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 1642–1643.
- [286] F. A. Green, *Inflammation* **1988**, 12, 133–140.
- [287] F. Thiebaut, S. J. Currier, J. Whitaker, R. P. Haugland, M. M. Gottesman, I. Pastan, M. C. Willingham, *J. Histochem. Cytochem.* **1990**, 38, 685–690.
- [288] T. Tashima, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 121–130.
- [289] A. Bolhassani, B. S. Jafarzade, G. Mardani, *Peptides* **2017**, 87, 50–63.
- [290] J. L. Ma, H. Wang, Y. L. Wang, Y. H. Luo, C. B. Liu, *Mol. Pharm.* **2015**, 12, 2040–2048.
- [291] D. Koley, A. J. Bard, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, 107, 16783–16787.
- [292] A. Sillen, Y. Engelborghs, *Photochem. Photobiol.* **1998**, 67, 475–486.

## A Anhang

### A.1 Synthese

#### A.1.1 4-(4,4-Difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a,-diazas-indacene-8-yl)-buttersäure

In einem ausgeheizten Zweihalskolben mit Rückflusskühler wird unter Stickstoffatmosphäre Glutarsäureanhydrid (**2**, 408 mg, 3.6 mmol) vorgelegt und in 60 mL absolutem THF aufgelöst. Nach Zugabe von 2,4-Dimethylpyrol (**1**, 560 mg, 6 mmol) wird vorsichtig Bortrifluorid-Etherat (1.02 g, 911  $\mu$ L, 5.2 mmol) zugegeben. Die Mischung wird 8 h unter Rückfluss gerührt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Als nächstes wird zuerst Triethylamin (2.42 g, 3.315 mL, 24 mmol), dann erneut Bortrifluorid-Etherat (2.56 g, 2.286 mL, 18 mmol) zugegeben. Die tiefgrüne Lösung wird 4 h bei 50°C gerührt, auf Eis gequencht und gründlich mit Wasser gewaschen. Die wässrige Lösung wird anschließend mit Dichlormethan extrahiert und für 2 h über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird unter Vakuum entfernt und der dunkle ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Normalphase, PE/EE/HAc 80/40/1). Nach entfernen des Laufmittels im Hochvakuum werden 240.6 mg (0.72 mmol, 20% Ausbeute) rote Kristalle des Tetramethylbodipy-Farbstoffes **3** erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  6.05 (s, 2H), 3.05 – 2.95 (m, 2H), 2.54 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.51 (s, 6H), 2.41 (s, 6H), 1.96 (p,  $J = 8.0$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  167.79, 154.42, 144.00, 140.46, 131.39, 121.93, 30.91, 25.58, 16.41, 14.48.



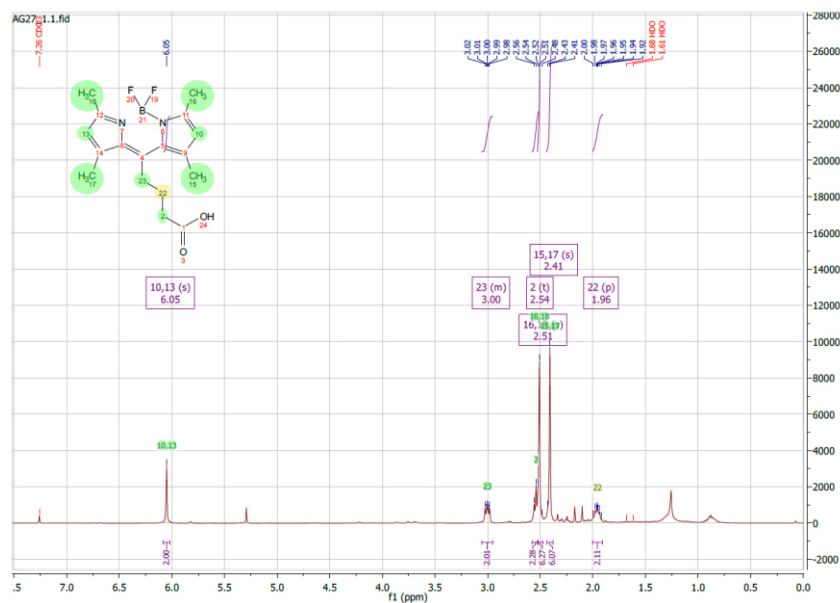
### A.1.2 4-(4,4-Difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a,-diazas-indacene-8-yl)-buttersäure-N-hydroxysuccinimid Ester

EDCI (**4**, 171 mg, 1.485 mmol) wird zusammen mit Triethylamin (160.6 mg, 220  $\mu$ L, 1.485 mmol) und N-hydroxysuccinimid (102.5 mg, 0.891 mmol) zu einer Lösung von **3** (100 mg, 0.291 mmol) in 2.2 mL THF gegeben und für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit destilliertem Wasser gequenchet und die Mischung mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden 2 h über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Normalphase, DCM/EE 20:1) und das Laufmittel entfernt. Es werden 278.22 mg (0.67 mmol, 45% Ausbeute) des Bodipy-NHS-Esters als roter Feststoff erhalten.

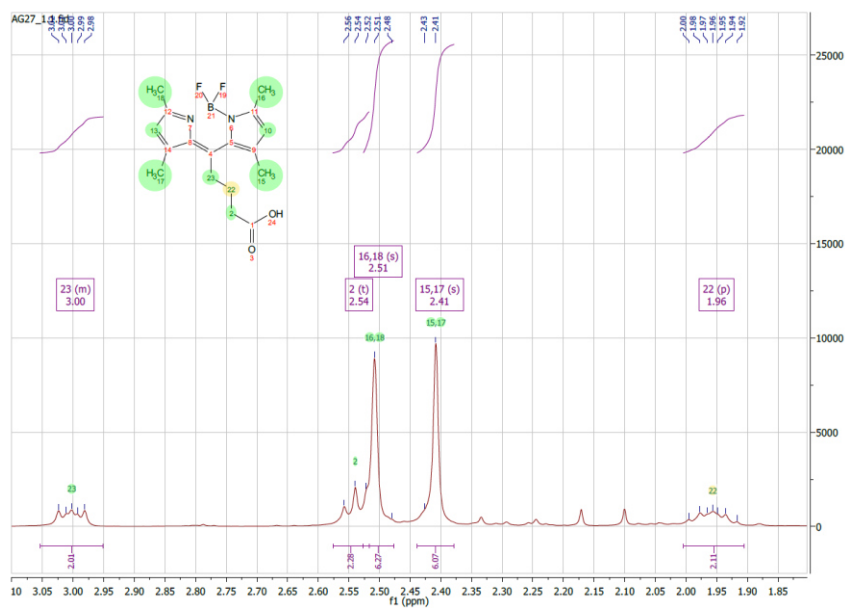
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  6.05 (s, 2H), 3.13 – 3.03 (m, 2H), 2.87 – 2.74 (m, 6H), 2.51 (s, 6H), 2.40 (s, 6H), 2.11 – 1.98 (m, 2H).

## A.2 NMR-Spektren

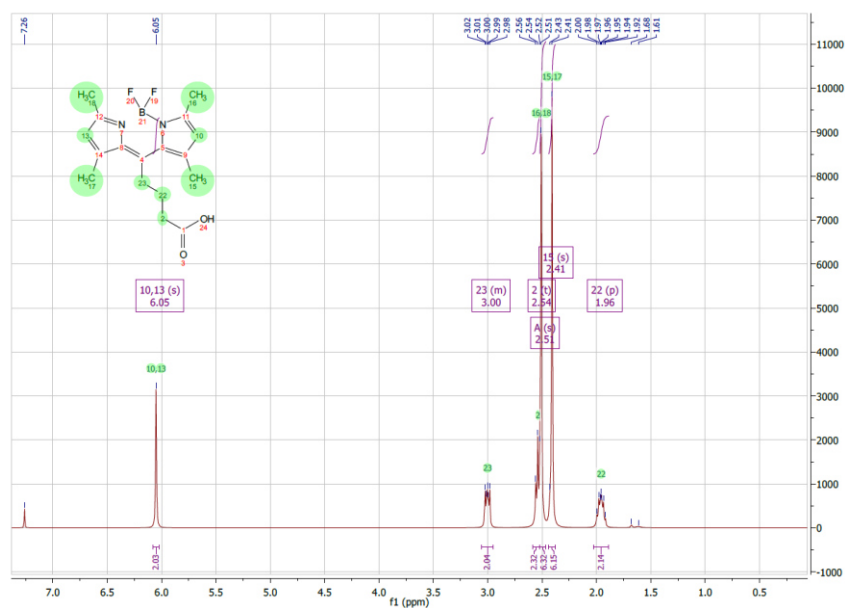
### A.2.1 4-(4,4-Difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a,-diazas-indacene-8-yl)-buttersäure



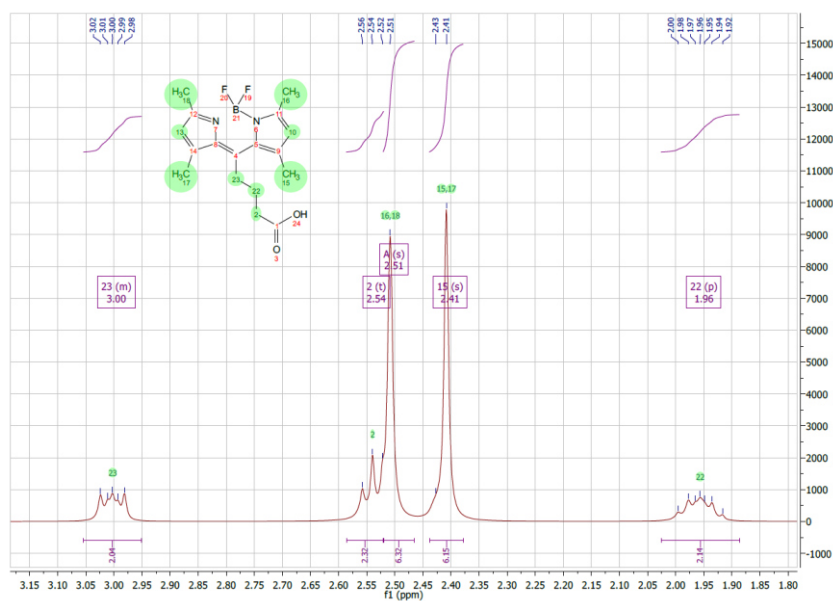
**Abbildung A. 1** Experimentelles  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) des Compound **3**. Zusätzliche Signale können Verunreinigungen durch Schliff fett, Essigsäure und Essigsäureethylester zugeordnet werden.



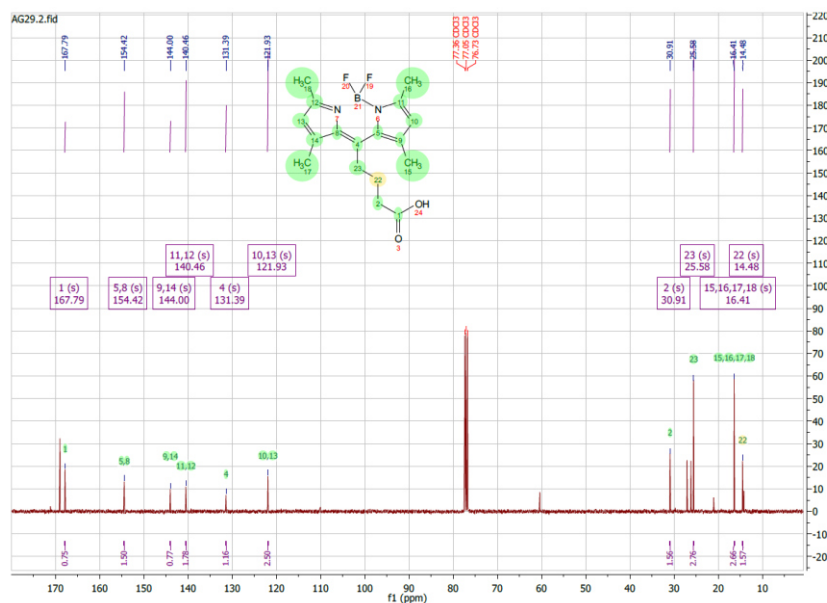
**Abbildung A. 2** Ausschnitt des experimentellen  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) des Compound **3**.



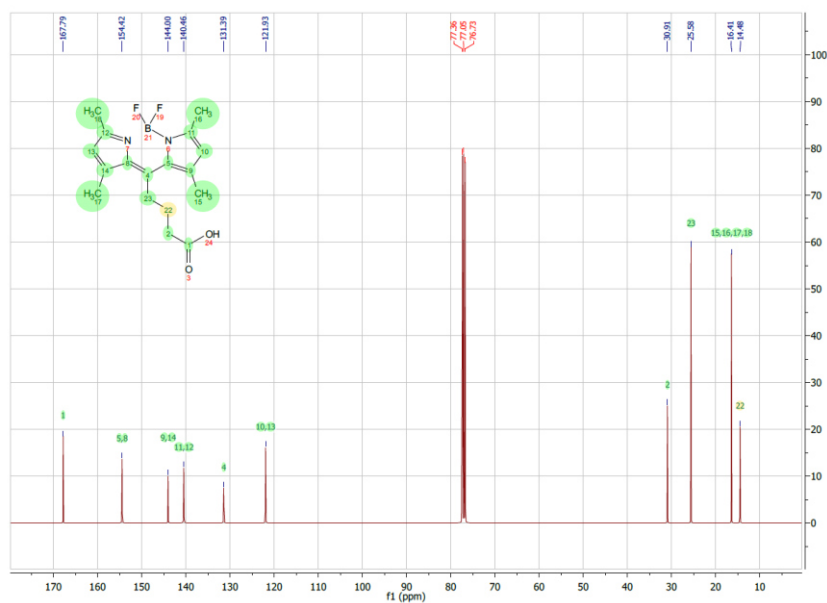
**Abbildung A. 3** Mathematische Bereinigung des Spektrums durch Identifikation der Verunreinigungspeaks und erzeugen eines reinen Spektrums.



**Abbildung A. 4** Ausschnitt von Abbildung A. 3.

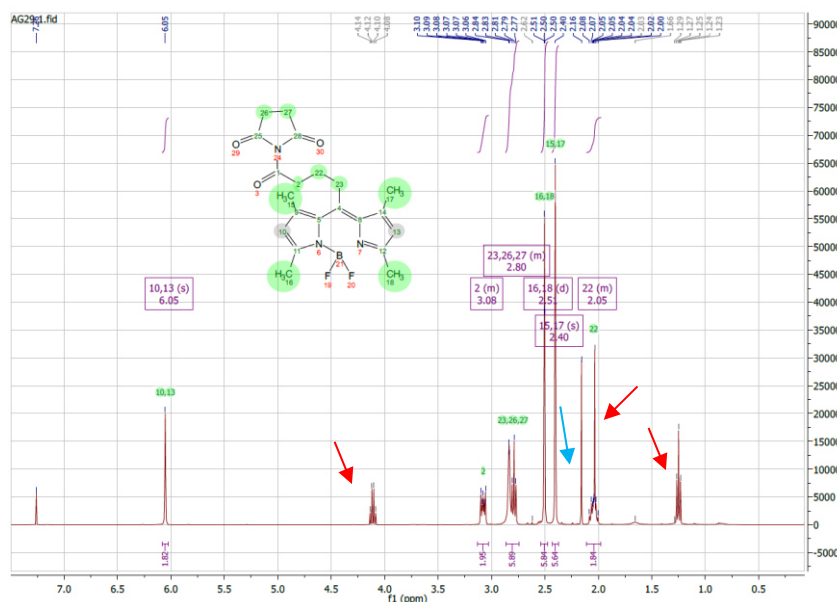


**Abbildung A. 5** Experimentelles  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) des Compound 3. Zusätzliche Signale können Verunreinigungen durch Schliff fett, Essigsäure und Essigsäureethylester zugeordnet werden.

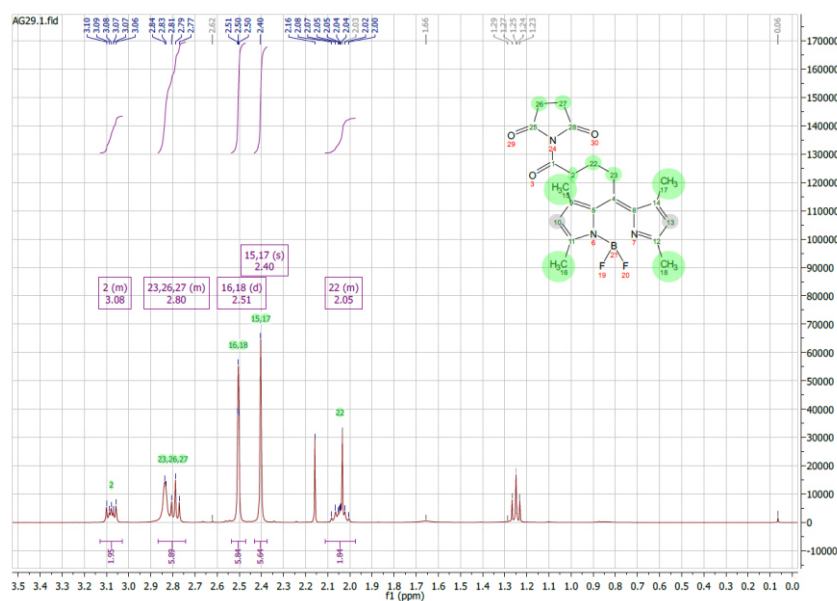


**Abbildung A. 6** Mathematische Bereinigung des Spektrums durch Identifikation der Verunreinigungspeaks und erzeugen eines reinen Spektrums.

## A.2.2 4-(4,4-Difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a,-diazas-indacene-8-yl)-buttersäure-N-hydroxysuccinimid Ester



**Abbildung A. 7** Experimentelles  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) des Compound **6**. Das Spektrum weist Rückstände von Essigsäureethylester (rot) und Aceton (blau) auf. Bei der Integration des Multipletts bei 2.05 ppm wurde das starke Singulett des Essigsäureethylesters berücksichtigt und herausgerechnet.



**Abbildung A. 8** Vergrößerter Ausschnitt von Abbildung A. 7

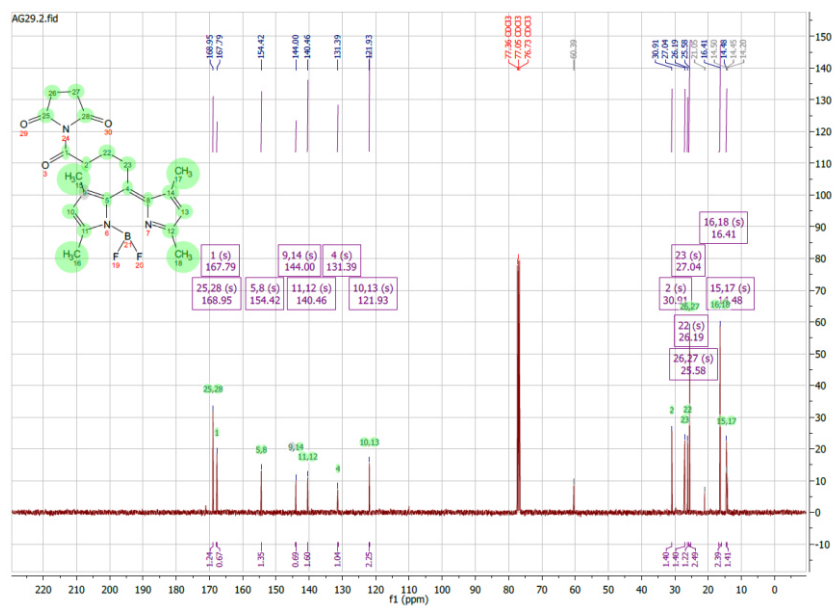


Abbildung A. 9 Experimentelles  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) des Compound 6.

### A.2.3 DAHK-BDPY - N2-aspartylalanylhistidyl-N6-(4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4l4,5l4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)butanoyl)lysine

**Tabelle A. 1** Zuordnung der chemischen Verschiebungen des Zielmoleküls DAHK-BDPY. Die Struktur und die Label der Atome sind in Abbildung A. 10 dargestellt.

Atom#	C/X Label	C Shift	XHn	H Label	H Shift	C/X Multiplicity	H Multiplicity	COSY	TOCSY	H HMBC	C HMBC
8	M01	171.713	C			m				1.18, 4.18, 4.38	
20	M02	172.618	C			br s				2.39, 2.59, 3.71	
16	M03	173.335	C			m				1.53, 3.93	
32	M04	171.143	C			m				1.76, 2.28, 3.00, 8.10	
11	M05	170.036	C			m				3.93, 4.38	
3	M06	171.137	C			s				2.39, 2.59	
47	M07	14.077	CH3	H 69	2.392	s	s			6.22	130.75, 141.03
36	M08	146.427	C			br s				2.93, 6.22	
41	M09	141.035	C			s				2.39, 6.22	
26	M10	134.843	CH	H 37	7.551	br s	s	6.74	6.74	6.74	
24, 37	M11	130.747	C			br s				2.39, 2.93, 6.22	
42	M12	121.701	CH	H 33	6.218	br s	s	2.4		2.4	14.08, 15.80, 130.75, 141.03, 146.43, 153.11
43	M13	153.106	C			s				2.40, 6.22	
48	M14	15.8	CH3	H 70	2.399	s	br s	6.22		6.22	121.70, 153.11
12	M15	17.603	CH3	H 36	1.183	s	m	4.18	4.18	4.18	49.08, 171.71
53	M16	22.747	CH2	H 57	1.183	s	m	1.34, 1.53	3	1.53, 3.00, 3.93	
35	M17	27.187	CH2	H 93	2.929	s	m	1.76	1.76, 2.28	1.76, 2.28, 27.66	27.66, 130.75, 146.43
55	M18	27.665	CH2	H 92	1.765	s	m	2.28, 2.93	2.28, 2.93	2.28, 2.93, 27.19	27.19, 35.39, 171.14
54	M19	28.894	CH2	H 56	1.337	s	br d (7.78)	1.18, 3.00, 1.53, 1.67, 3.00, 3.93, 7.82, 8.10	3	3	
29	M20	28.993	CH2	H 95	2.92	br s	m	4.38	4.38, 8.19		
19	M21	31.159	CH2	H 98	1.669	s	m	1.53	1.34	3.93	
19	M21	31.159	CH2	H 54	1.532	s	br d (9.87)	1.18, 1.67, 3.93	1.34, 3.00, 3.93	3.93	22.75, 53.30, 173.34
33	M22	35.392	CH2	H 50	2.276	s	m	1.76, 2.30	1.76, 2.93	1.76	27.19, 27.66, 171.14
4	M23	38.163	CH2	H 97	2.389	s	m	3.71		3.71	50.89, 171.14, 172.62
4	M23	38.163	CH2	H 99	2.589	s	m	3.71		3.71	171.14, 172.62
30	M24	38.615	CH2	H 44	3	s	br dd (12.72, 6.88)	1.34, 8.10	1.18, 1.34, 1.53, 8.10		22.75, 28.89, 171.14
7	M25	49.078	CH	H 39	4.175	s	br s	1.18, 8.58	1.18, 8.58	1.18	17.60, 171.71
2	M26	50.89	CH	H 42	3.709	s	m	2.39, 2.59		2.39	38.16, 172.62
23	M27	53.078	CH	H 38	4.38	s	br dd (12.94, 7.85)	2.92, 8.19	2.92, 8.19		170.04, 171.71
15	M28	53.305	CH	H 40	3.93	s	br d (5.54)	1.53, 7.82	1.34, 1.53, 7.82, 8.10	1.53	22.75, 31.16, 170.04, 173.34
28			CH	M02	6.744	s	s	7.55	7.55		134.84
14			NH	H 41	7.818		br s	3.93	1.34, 3.93		
31			NH	M04	8.1		br s	3	1.34, 3.00, 3.93		171.14
10			NH	M07	8.192		m	4.38	2.92, 4.38		
6			NH	M08	8.578		s	4.18	4.18		

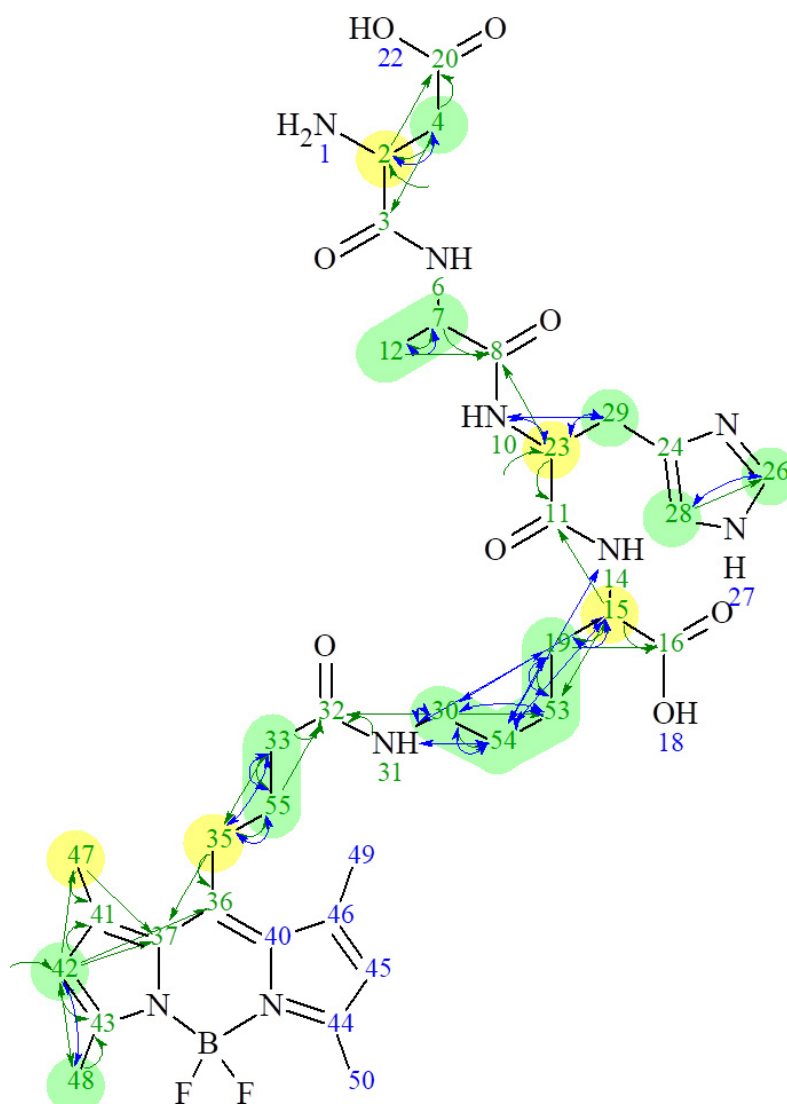
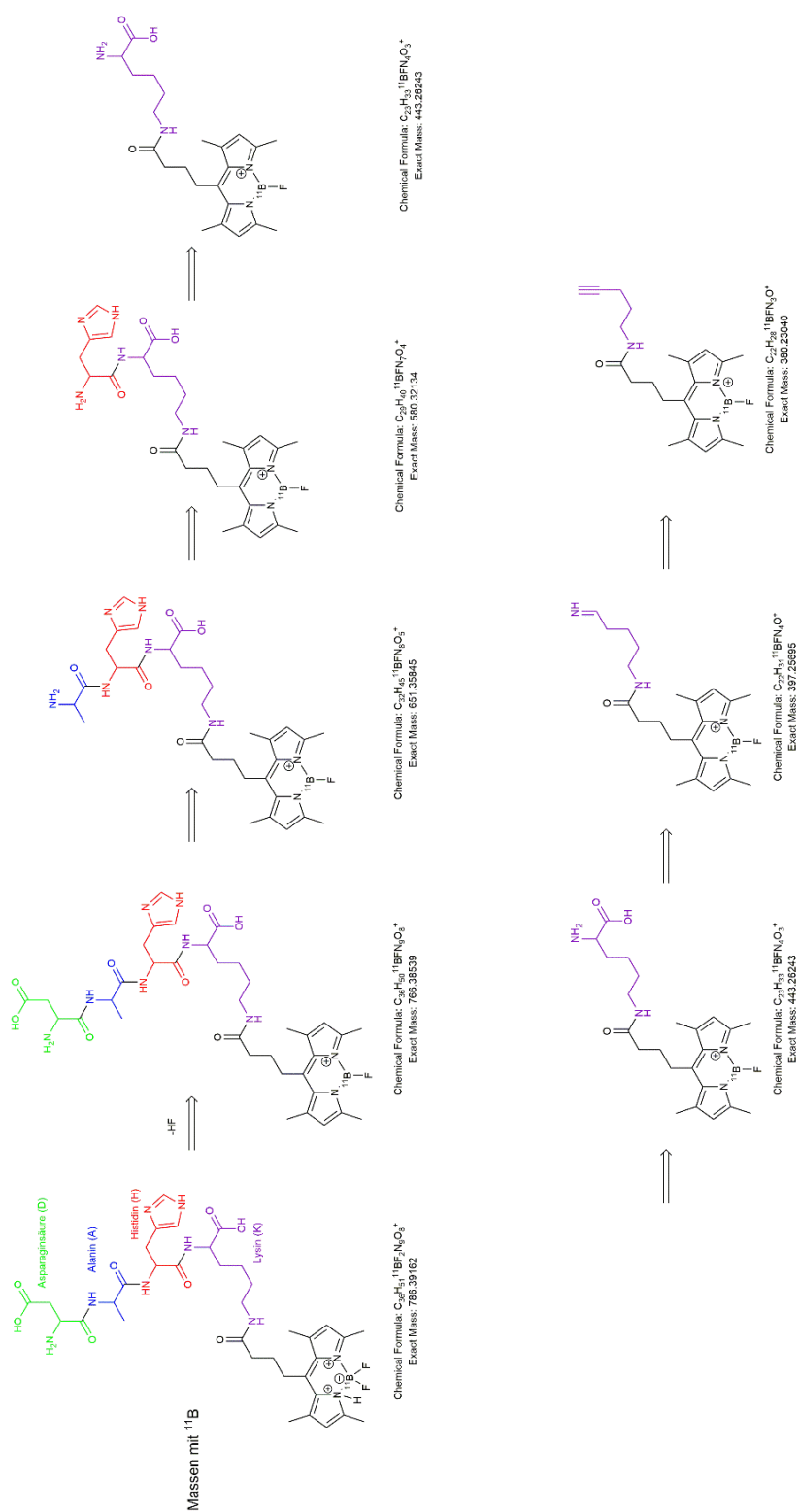


Abbildung A. 10 Zuordnungen sowie Kopplungen der Kerne.



## A.3 Hochauflösenden Massenspektrometrie



**Abbildung A. 11** Vollständige Fragmentierung und zugehörige exakte Massen des DAHK-BDPY. Zur Vereinfachung und besseren Übersicht wurde nur der  $^{11}\text{B}$ -Kern betrachtet, da dieser am häufigsten natürlich vorkommt.

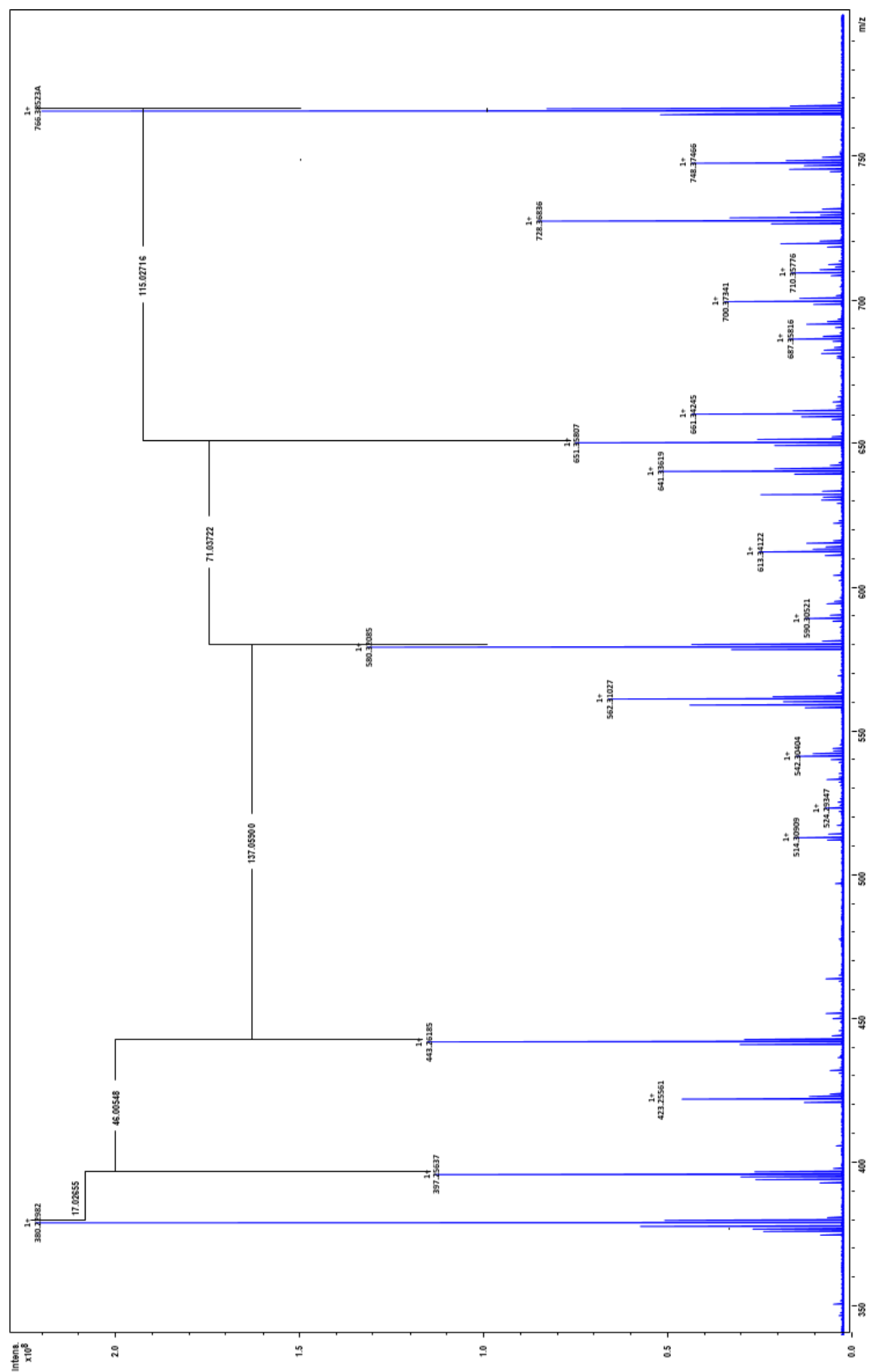


Abbildung A. 12 Fragmentationsmassenspektrum des DAHK-BDPY.

## A.4 Wahrscheinlichkeitsbetrachtung im ungepufferten System

### A.4.1 Berechnung der Teilchenanzahl im Anregungsvolumen

Annahmen:

Größe	Wert
Detektionsvolumen $V_{eff}$ / fL	1
Sensorkonzentration $[L_{ges}]$ / nM	1
Dissoziationskonstante $^cK_D$ / fM	137

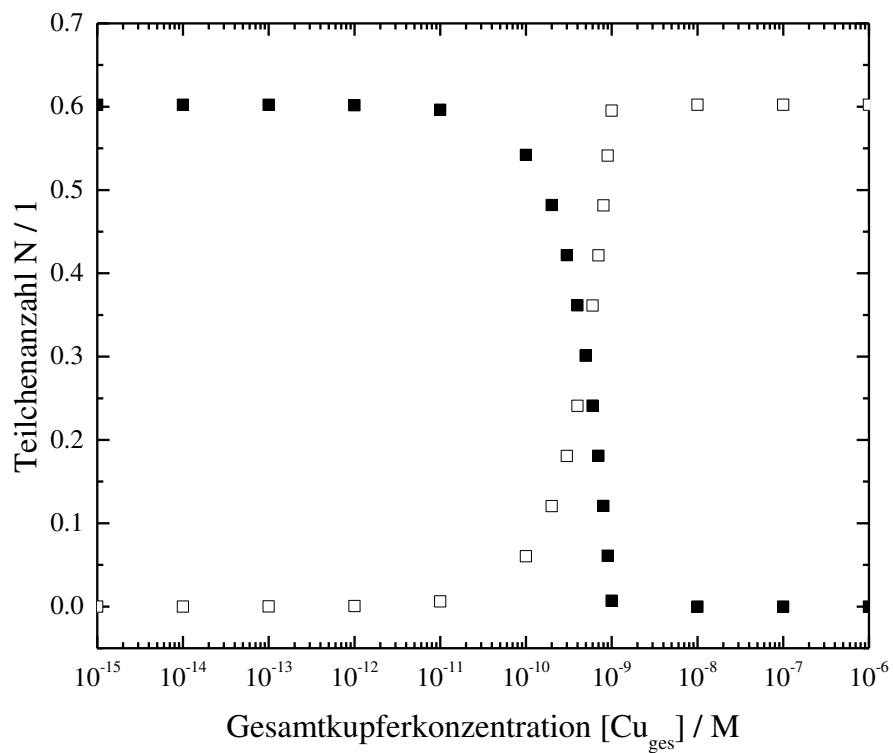
Gleichungen:

$$N = cV_{eff}N_A \quad (A.1)$$

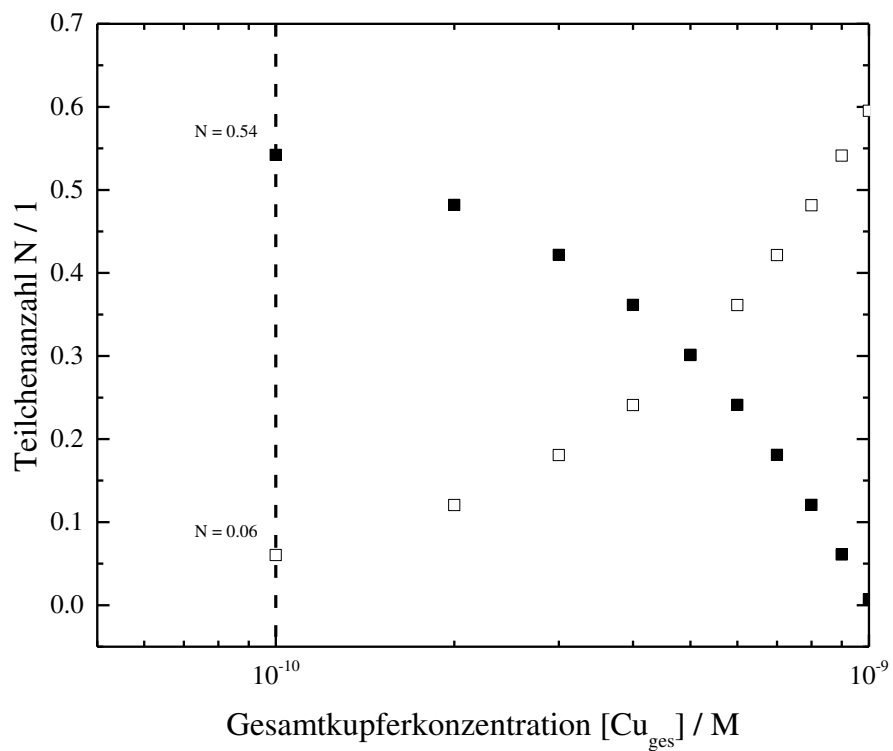
$$\theta_b = 1 + \frac{^cK_D + [Cu_{ges}^{2+}] - [L_{ges}]}{2[L_{ges}]} - \sqrt{\left(\frac{^cK_D + [Cu_{ges}^{2+}] - [L_{ges}]}{2[L_{ges}]}\right)^2 + \frac{^cK_D}{[L_{ges}]}} \quad (A.2)$$

$$N_{CuL} = N_{ges}\theta_b \quad \wedge \quad N_L = N_{ges}(1 - \theta_b) \quad (A.3)$$

Daraus ergibt sich folgendes Diagramm für die Entwicklung der mittleren Teilchenzahl  $N$  im Detektionsvolumen  $V_{eff}$ :



**Abbildung A. 13** Entwicklung der mittleren Teilchenzahl (Ligand L: schwarze gefüllte Quadrate; Komplex CuL: offene Quadrate) im Detektionsvolumen bei steigender Gesamtkupferkonzentration



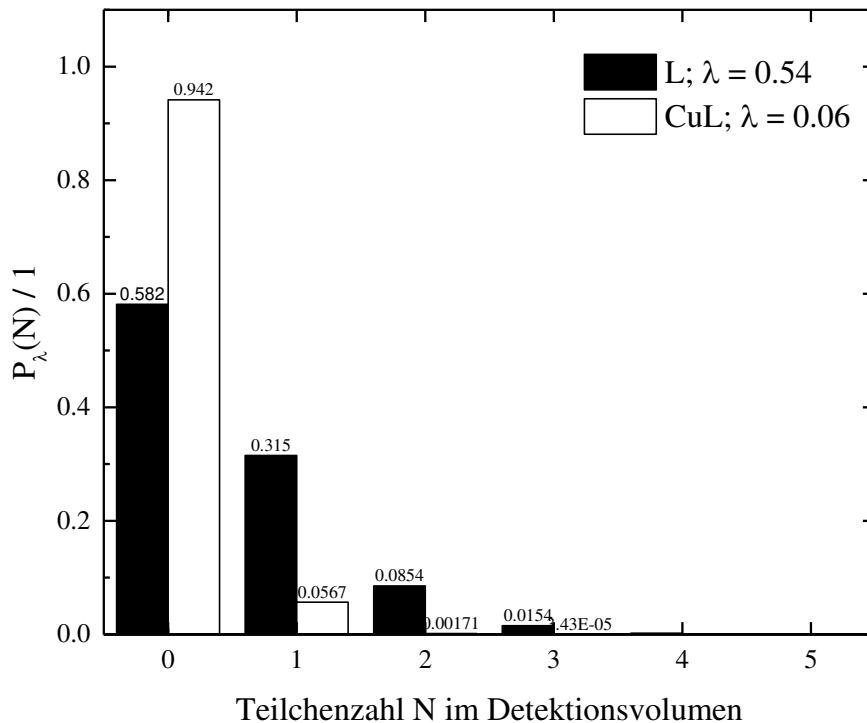
**Abbildung A. 14** Vergrößerter Ausschnitt der Teilchenzahlentwicklung mit den Werten für  $[Cu_{ges}^{2+}] = 100 \text{ pM}$ .

## A.4.2 Berechnung Wahrscheinlichkeitsverteilung

Die Wahrscheinlichkeit, ein Teilchen im Detektionsvolumen zu beobachten, lässt sich mit Hilfe der Poisson-Verteilung berechnen. Bei der Poisson-Verteilung  $P_\lambda(k)$  handelt es sich um eine diskrete Wahrscheinlichkeitsverteilung, welche jeder natürlichen Zahl  $k \in \mathbb{N}$  eine Wahrscheinlichkeit  $P$  zuordnet, die durch den Parameter  $\lambda \in \mathbb{R}_+$  bestimmt ist. Dieser Parameter  $\lambda$  ist der Erwartungswert der Poisson-Verteilung.

$$P_\lambda(k) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda} \quad (\text{A.4})$$

Angewendet auf den in A.4.1 gezeigten Fall der Teilchenanzahl im Detektionsvolumen bedeutet dies, dass der Erwartungswert der Poisson-Verteilung im Falle des freien Liganden  $L$  bei  $[\text{Cu}_{\text{ges}}^{2+}] = 100 \text{ pM}$   $\lambda_L = 0.54$  und im Falle des Komplexes  $\lambda_{\text{CuL}} = 0.06$  beträgt. Daraus ergibt sich folgende Verteilungsfunktion.



**Abbildung A. 15** Poisson-Verteilungsfunktionen zu den zugehörigen mittleren Teilchenzahlen im Detektionsvolumen.

Aus der Verteilungsfunktion ergibt sich, dass die Wahrscheinlichkeit, ein oder mehrere Teilchen im Detektionsvolumen zu finden, bei 6 % für den Fall des Komplexes bzw. bei 42 % für den Fall des freien Liganden liegt.

## A.5 *In-vivo* Fluoreszenzlebensdauermessungen

### A.5.1 FLIM an Hep G2 Zellen

Zur *in-vivo* Untersuchung des Verhaltens des DAHK-BDPY-Sensor wurde versucht, den Sensor in Hep G2 Zellen einzubringen. Hep G2 Zellen wurden ausgewählt, da sie zum einen ein gängiges Zellmodell darstellen und zum anderen, weil es sich um eine humane Leberkrebszelllinie handelt. Zum einen ist die Leber das Hauptspeicherorgan für Kupfer im Körper<sup>[73]</sup>, zum anderen zeigen Krebszellen ohnehin erhöhte Kupferlevel<sup>[60]</sup>.

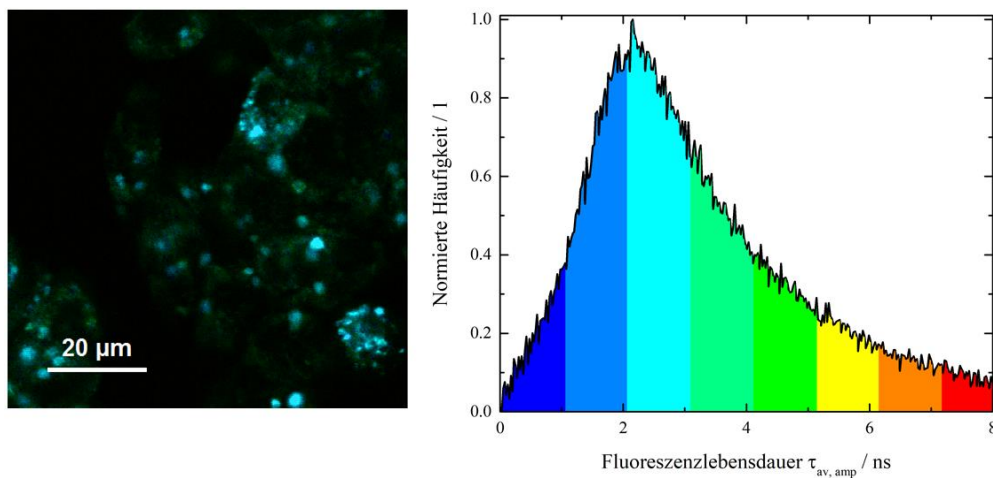
Die Hep G2 Zellen wurden nach den üblichen Protokollen gezüchtet und inkubiert. Zur Durchführung der FLIM-Experimente wurde das Nährmedium der Zellkulturen entfernt und diese 4 mal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 3 h bei 37°C in einem DPBS Medium mit 1µM DAHK-BDPY Farbstoff und mit 0.1v% des Tensids Triton X-100 zu Erhöhung der Zellpermeabilität<sup>[291]</sup> inkubiert. Anschließend wurde das fluoreszierende Medium wieder entfernt, die Zellkulturen mit DPBS gewaschen und in DPBS inkubiert.

Einigen der Proben wurden das CuNTA<sup>-</sup>/NTA Metallionenpuffersystem sowie Pyrithion als Kupfer(II)-Ionophor<sup>[43]</sup> zugefügt, um entsprechende freie Kupfer(II)-Konzentrationen in den Zellen einzustellen.

Nachfolgend sind einige FLIM-Bilder der Zellkulturen dargestellt. Die Anregung der Probe erfolgte mit  $\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$ ,  $f = 20 \text{ MHz}$ ,  $P = 20 \text{ µW}$  durch ein 40x 1.2 N.A. C-Apochromat Wasser Objektiv (Zeiss GmbH). Es wurden 512x512 Pixel mit einer Integrationszeit von 2ms/pixel abgerastert. Jeder Pixel wurde einem Rekonvolutionsfit unterzogen und die mittlere amplitudengewichtete Fluoreszenzlebensdauer dargestellt.

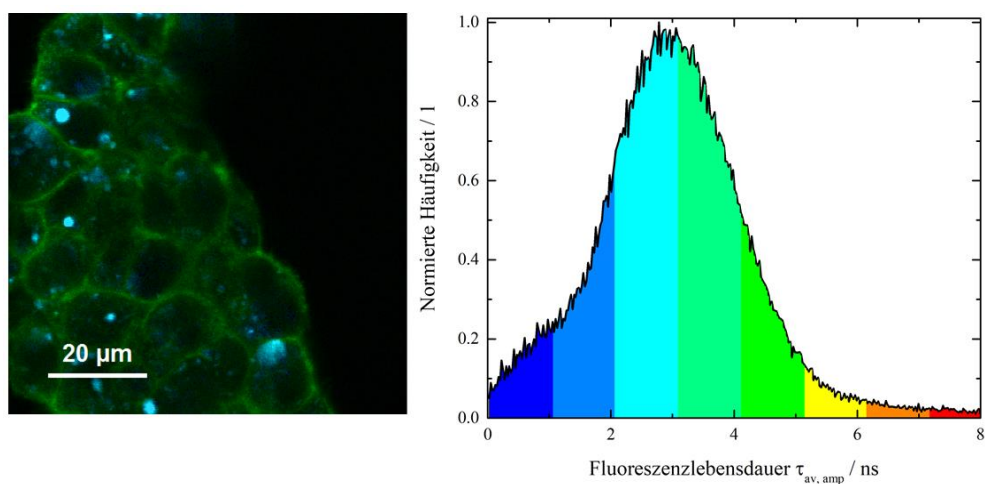
In Abbildung A. 16 ist die Blindmessung der Hep G2 Zellen ohne Zugabe des DAHK-BDPY-Sensors gezeigt. Es ist sogar schon bei moderaten Anregungsintensitäten eine

deutliche Autofluoreszenz der Zellen mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von  $\tau_{av, amp} = 2.16$  ns zu sehen.



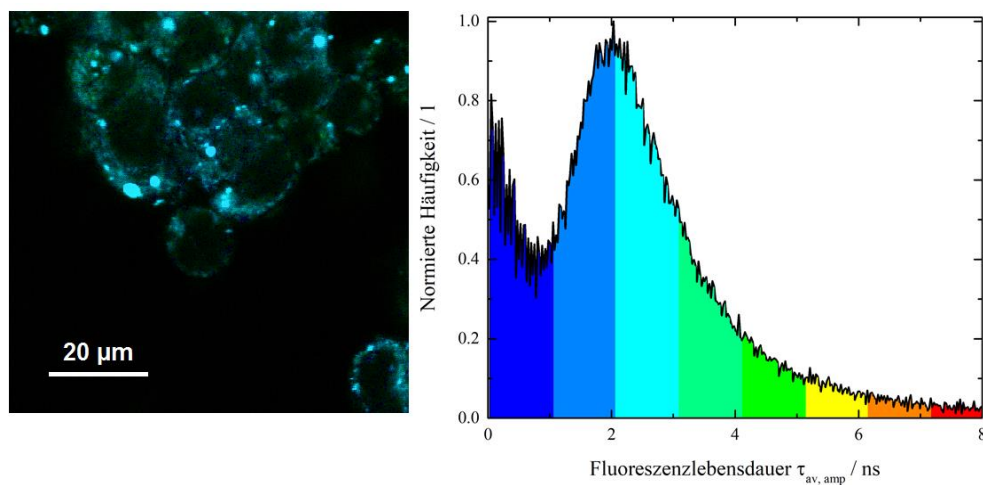
**Abbildung A. 16** FLIM-Bild einer Hep G2 Zellkultur in DPBS. Der Zellkultur wurde kein fluoreszenter Farbstoff beigelegt. Zu sehen ist nur die Autofluoreszenz der Hep G2 Zellen mit einer Fluoreszenzlebensdauer von  $\tau_{av, amp} = 2.16$  ns.

In unterer Darstellung ist eine Hep G2 Zellkultur nach Inkubation mit dem DAHK-BDPY-Sensor dargestellt. Grün eingefärbt ist die lange Lebensdauerkomponente des Sensors mit 4.7 ns. Der Sensor scheint sich vor allem an die Zellmembran anzulagern, nicht jedoch in das Zellinnere.

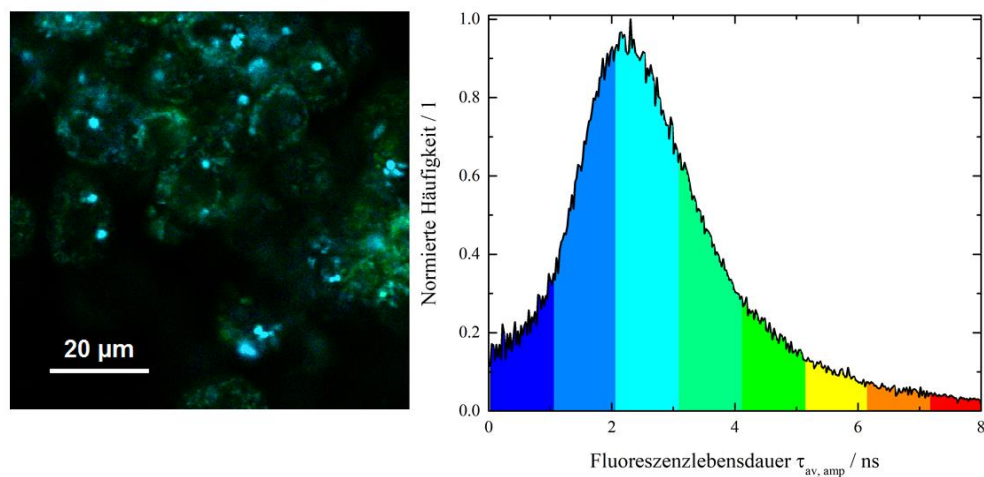


**Abbildung A. 17** Aufnahme nach Zugabe und Inkubation mit dem DAHK-BDPY-Sensor. Es sind neben Bereichen mit geringer Lebensdauer (hellblau) im Bereich um die 2 ns, große Bereiche mit einer langen Lebensdauer (grün) von ca. 4.7 ns zu erkennen.

Abbildung A. 18 wurde nach der Zugabe einer Lösung mit einer freien Kupfer(II)-Konzentration von 90pM aufgenommen. Auf dem Mikroskopie-Bild (links) ist deutlich zu erkennen, dass es fast nur noch blaue Bereiche mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von ca. 2.16 ns gibt. Dies entspricht der Lebensdauer der Blindprobe, und es kann davon ausgegangen werden, dass hauptsächlich die Autofluoreszenz der Zellen aufgenommen wurde. Interessanter ist der linke Teil des Lebensdauerhistogramms, der einen nicht unerheblichen Anteil an sehr kurzen Lebensdauern zwischen 0 und 0.5 ns darstellt. Dies würde zu der Lebenszeit des DAHK-BDPY-Cu-Komplexes passen.



**Abbildung A. 18** FLIM-Aufnahme der in Abbildung A. 14 gezeigten Probe (anderer Bildausschnitt) inkubiert mit einer freien Kupfer(II)-Konzentration von 90 pM. Es zeigt sich eine deutliche Verschiebung zu kürzeren Lebensdauern.



**Abbildung A. 19** Die Probe aus Abbildung A. 15 nach Erhöhung der Kupferkonzentration auf 50 nM.



Wird die Konzentration an Kupfer(II) jedoch weiter erhöht auf bis zu 50 nM, so steigt nicht der Anteil an den o.g. kurzen Lebensdauern, sondern er verschwindet wieder und es ist ausschließlich die Autofluoreszenz zu sehen (vgl. Abbildung A. 19)

Grund dafür ist wahrscheinlich folgender: Der DAHK-BDPY-Sensor ist nicht membran-gängig und adsorbiert nur locker an der Zellmembran. Da nach jedem Inkubationsschritt die Zellkultur mit frischem Medium gewaschen wurde, wurde so infolgedessen auch der adsorbierte Sensor von der Zellmembran entfernt.

Änderungen der Triton X 100 Konzentration, der Inkubationsdauer und der Sensor-Konzentration konnten dieses Problem leider nicht beheben.